

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I
FACULTE DE PHARMACIE

Année 1978

N° 157

THESE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - Faculté de Pharmacie

et soutenue publiquement le 24 Novembre 1978

pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'ETAT ES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

par

Jacques BIENVENU

né le 24 Février 1950

à TARARE (Rhône)

**LES FORMES ATYPIQUES DE DEFICIT
EN ALPHA-1, 4-GLUCOSIDASE ACIDE**

**Etude enzymatique
et contribution au diagnostic biochimique**

JURY : Monsieur le Professeur J. COTTE
Monsieur le Professeur H. G. HERS
Monsieur le Professeur R. MALLEIN
Monsieur le Professeur C. COLLOMBEL
Mademoiselle M. MATHIEU

90

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
FACULTÉ DE MÉDECINE

Année 1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

LES FORMES APPROXIMATIVES DE DÉFICIT
EN ALPHABÈTE NUMÉRIQUE ACTUEL

Émile Zola, 1898

et contributions sur les formes numériques

ATM : Monsieur le Professeur J. COYNE
Monsieur le Professeur H. G. 1972
Monsieur le Professeur F. HALLER

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I
FACULTE DE PHARMACIE

Année 1978

N°

THESE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - Faculté de Pharmacie

et soutenue publiquement le 24 Novembre 1978

pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'ETAT ES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

par

Jacques BIENVENU

né le 24 Février 1950

à TARARE (Rhône)

**LES FORMES ATYPIQUES DE DEFICIT
EN ALPHA-1, 4-GLUCOSIDASE ACIDE**

**Etude enzymatique
et contribution au diagnostic biochimique**

JURY : Monsieur le Professeur J. COTTE
Monsieur le Professeur H. G. HERS
Monsieur le Professeur R. MALLEIN
Monsieur le Professeur C. COLLOMBEL
Mademoiselle M. MATHIEU

Année 1978

THESE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - Faculté de Pharmacie

et soutenue publiquement le 24 Novembre 1978

pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'ETAT ES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

par

Jacques SITHVENU

né le 24 Février 1950

à TARARE (Rhône)



LES FORMES ATYPIQUES DE DEFICIT
EN ALPHA-1,4-GLUCOSIDASE ACIDE

Etude enzymatique

et contribution au diagnostic biochimique

JURY : Monsieur le Professeur J. COTTE
Monsieur le Professeur H. G. HERS
Monsieur le Professeur R. MAILLON
Monsieur le Professeur C. COLLOMBET
Mademoiselle M. MATTHEU

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD

Président : Monsieur le Professeur D. GERMAIN
Premier Vice-Président : Monsieur le Professeur ELBAZ
Deuxième Vice-Président : Monsieur P. PONCET, Maître-Assistant
Troisième Vice-Président : Monsieur C. BADOR, Etudiant
Secrétaire Général de l'Université : Monsieur J. RAMBAUD
Administrateur Civil.

DIRECTEURS DES U.E.R. ET DOYENS DES FACULTES :

FACULTE DE MEDECINE GRANDE-BLANCHE : Monsieur Bernard SALLE, M.C.A.
FACULTE DE MEDECINE ALEXIS-CARREL : Monsieur le Professeur René MORNE
U.E.R. DE MEDECINE LYON NORD : Monsieur Jean-Pierre NEIDHARDT, M.C.A.
FACULTE DE MEDECINE SUD-OUEST : Monsieur le Professeur Jean NORMAND
FACULTE DE PHARMACIE : Monsieur le Professeur Charles-Albert BIZOLLON
U.E.R. DE TECHNIQUES DE READAPTATION : Monsieur Alain MORGON, M.C.A.
U.E.R. DE BIOLOGIE HUMAINE : Monsieur Jean-Pierre REVILLARD, M.C.A.
U.E.R. I.R.E.P.S. : Monsieur Albert MILLON, Professeur D'E.P.S.
U.E.R. DE SCIENCES ODONTOLOGIQUES : Monsieur le Docteur Roger VINCENT
U.E.R. DE MATHÉMATIQUES : Monsieur le Professeur Edmond COMBET
U.E.R. DE PHYSIQUE : Monsieur le Professeur Jean DELMAU
U.E.R. DE CHIMIE-BIOLOGIE : Monsieur le Professeur Jean HUET
U.E.R. DE SCIENCES DE LA NATURE : Monsieur le Professeur René GINET
U.E.R. DE SCIENCES PHYSIOLOGIQUES : Mademoiselle le Professeur Jeanne-Françoise WORBE
U.E.R. DE PHYSIQUE NUCLEAIRE : Monsieur le Professeur Mark GUSAKOW
I.U.T. n° 1 : Monsieur le Professeur Bernard POWYET
I.U.T. n° 2 : Monsieur J. GALLET, Directeur E.N.S.A.M.
OBSERVATOIRE DE LYON : Monsieur Guy MONNET, Astronome Adjoint
U.E.R. DE MECANIQUE : Mademoiselle le Professeur Geneviève COMTE-BELLOT

A Françoise,

A nos enfants Marie et Pierre-Edouard

Avec tout mon amour,

A mes grands-parents,

A mes parents,

A mes beaux-parents,

A mon frère et mon beau-frère, à mes belles-soeurs,

A toute ma famille,

A tous mes amis.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE,

Monsieur le Professeur J. COTTE,

Nous sommes fier d'être assistant au sein de l'équipe dynamique qu'il dirige à l'hôpital DEBROUSSE. Depuis notre externat, nous admirons la personnalité exceptionnelle de notre "patron", son efficacité, son esprit de synthèse, sa vivacité, et son "intelligence des affaires".

Qu'il veuille bien trouver ici la marque de notre reconnaissance et de notre respectueux attachement.

A NOS JUGES :

A Monsieur le Professeur H.G. HERS,

Sa présence dans notre jury de thèse nous honore. Nous le remercions d'être venu à LYON à l'occasion de notre thèse car, du fait de sa haute compétence scientifique, ses tâches sont très nombreuses. Il a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire à BRUXELLES.

Nous lui formulons l'expression de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur R. MALLEIN,

Durant les deux semestres passés dans son service, nous avons été séduit par l'étendue de ses connaissances dans de nombreux domaines. Nous sommes très heureux qu'il ait accepté de juger notre travail car nous apprécions sa rigueur scientifique.

Il a toujours témoigné d'une grande bienveillance à notre égard et nous lui exprimons très respectueusement nos sentiments de gratitude et d'admiration.

A Monsieur le Professeur C. COLLOMBEL,

Nous admirons beaucoup son enthousiasme, sa capacité de travail et son souci de documentation. Il a toujours su nous faire bénéficier de son expérience. Nous sommes particulièrement heureux de le voir siéger aujourd'hui parmi nos juges.

Qu'il en soit remercié très sincèrement.

A Mademoiselle M. MATHIEU, membre de l'Expert Panel of Enzymology,

C'est elle qui nous a confié ce sujet de thèse. Par sa disponibilité, ses grandes compétences dans le domaine enzymologique et son amitié, elle nous a encouragé et aidé tout au long de ce travail. Puisse celui-ci ne pas la décevoir.

Nous l'assurons de notre profonde reconnaissance et de notre fidèle dévouement.

A ceux qui ont également jugé notre travail :

Monsieur le Professeur P. GUIBAUD,

Nous le remercions de ses suggestions constructives

Monsieur le Professeur Th. de BARSY,

*Nous avons beaucoup apprécié sa connaissance du sujet de notre thèse
et ses conseils amicaux nous ont été très utiles.*

Au Docteur H. CARRIER,

Nous le remercions de son amicale collaboration.

A nos Maîtres des Hôpitaux de LYON,

A nos camarades d'Internat,

Aux Adjoints, Assistants, et Attachés de l'Hôpital DEBROUSSE,

*Leur précieuse amitié s'est particulièrement manifestée à l'occasion de
ce travail.*

A ceux qui ont collaboré à cette thèse et en particulier à
Anne-Marie BONARDOT dont nous avons beaucoup apprécié l'aide efficace.

Aux secrétaires du laboratoire pour leur gentillesse dans la réalisation
pratique de ce mémoire.

A tout le personnel du Laboratoire.

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance aux membres de l'Institut Mérieux (Marcy l'étoile), qui nous ont aidé dans ce travail :

- Monsieur le Docteur LIAUTAUD qui nous a aimablement fourni les placentas.

- Monsieur le Docteur ROUMIANDZEFF et Monsieur le Docteur COLOMBET qui ont aidé à établir le protocole d'immunisation des lapins.

Ce travail fait partie d'un contrat de recherche INSERM (AT 54-77-86).

PLAN

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : L'ALPHA-1,4-GLUCOSIDASE ACIDE LYSOSOMIALE

Propriétés de l'enzyme humaine et conséquences de son déficit.

I - LES LYSOSOMES ET LEUR EQUIPEMENT ENZYMATIQUE

I.1. Rappel sur les lysosomes

I.2. Les enzymes lysosomiales

II - L'ALPHA-1,4-GLUCOSIDASE ACIDE (MALTASE ACIDE)

II.1. Historique

II.2. Généralités sur les alpha-1,4-glucosidases

II.3. Purification de l'alpha-1,4-glucosidase acide et propriétés
de l'enzyme purifiée

II.4. Physiologie de l'alpha-1,4-glucosidase acide humaine

III - LE DEFICIT EN ALPHA-1,4-GLUCOSIDASE ACIDE ET SES CONSEQUENCES

III.1. Place de la glycogénose de type II parmi les autres
glycogénoses

III.2. La glycogénose de type II

DEUXIEME PARTIE : L'ALPHA-1,4-GLUCOSIDASE ACIDE HUMAINE

Etude de l'enzyme normale placentaire purifiée et de l'enzyme
résiduelle des formes atypiques de glycogénose de type II.

Application diagnostique.

I - MATERIEL ET METHODES

I.1. Matériel

I.2. Méthodes

II - RESULTATS

II.1. Purification de l'alpha-1,4-glucosidase acide placentaire humaine, propriétés de l'enzyme purifiée et préparation d'anticorps spécifiques

II.2. Etude des patients

III - DISCUSSION

III.1. Méthodologie

III.2. Etude des patients

III.3. Contribution au diagnostic des formes atypiques de glycogénose de type II

CONCLUSION

RESUME

SUMMARY

BIBLIOGRAPHIE

SIGNIFICATION DES ABREVIATIONS EMPLOYEES

AC	=	Anticorps
CK	=	Créatine-Kinase
DEAE-Cellulose	=	Diéthylaminoéthyl-cellulose
EDTA	=	Ethylène diamino tétracétique acide
GERL	=	Golgi endoplasmic reticulum lysosome
I.M.	=	Intramusculaire
I.P.	=	Intrapéritonéal
I.V.	=	Intraveineux
Ki.	=	Constante d'inhibition
Km	=	Constante de Michaelis - Menten
LDH	=	Lacticodéshydrogénase
M.U.-glucoside	=	4 méthylumbelliféryl- α -D-glucopyranoside
PAS	=	Periodic acid Schiff
P.M.	=	Poids moléculaire
Pts	=	Protéines
SDS	=	Sodium dodécyl sulfate
Tris	=	Tris -(hydroxy méthyl)-amino-méthane
UDPG	=	Uridine diphosphoglucose
Vmax	=	Vitesse maximale

- INTRODUCTION -

C'est en 1932 que POMPE donne la première description de glycogénose de type II (186). En 1963, HERS (101) démontre que cette affection est due à un *déficit en alpha-1,4-glucosidase acide ou maltase acide* (EC.3.2.1.20) : c'est la découverte des maladies lysosomiales.

Après l'identification de la forme classique de maladie de Pompe, diverses formes atypiques de déficit en maltase acide ont été décrites depuis 1965 : il s'agit généralement de syndromes à prédominance myopathique, apparaissant plus tardivement et caractérisés par une grande variabilité dans l'âge d'apparition et dans l'évolution clinique, mais par la constance de la diminution importante de l'activité de la maltase acide et l'aspect ultrastructural typique des muscles atteints (bien que le taux de glycogène tissulaire soit inconstamment augmenté).

Le travail que nous présentons rapporte les études biochimiques que nous avons effectuées dans un cas de maladie de Pompe et dans six cas de forme atypique de déficit en maltase acide.

La *première partie* est consacrée à des rappels sur le lysosome et la maltase acide : les propriétés physicochimiques, antigéniques et catalytiques de l'enzyme humaine sont décrites. Nous présentons ensuite une revue des 68 cas de forme atypique décrits dans la littérature.

Dans la *deuxième partie*, nous rapportons notre travail personnel :

- purification de la maltase acide humaine d'origine placentaire.
- étude des propriétés physicochimiques et cinétiques de l'enzyme purifiée.

- préparation d'anticorps spécifiques chez le lapin.
- étude de l'enzyme résiduelle dans différents tissus et milieux biologiques chez nos malades.
- mise au point d'un test diagnostique du déficit en maltase acide applicable aux urines.

Première PARTIE

L'ALPHA-1, 4-GLUCOSIDASE ACIDE LYSOSOMIALE

Propriétés de l'enzyme humaine et conséquences de son déficit

CHAPITRE I

LES LYSOSOMES ET LEUR EQUIPEMENT ENZYMATIQUE

I.1. RAPPEL SUR LES LYSOSOMES

I.1.1. La découverte des lysosomes (57) (58) (59)

L'histoire des lysosomes débute en décembre 1949 lorsque C. de DUVE, étudiant la *phosphatase acide* de foie de rat, observe que des préparations fraîches d'homogénat de foie ne présentent qu'une faible activité phosphatasique acide, alors que celle-ci augmente à la conservation. Plus les précautions prises pour broyer le tissu hépatique sont grandes, moins l'activité enzymatique retrouvée est élevée. La phosphatase acide possède donc un curieux phénomène de *latence*.

En quelques mois, l'explication de ces constatations est fournie : la phosphatase acide est enfermée à l'intérieur d'un sac imperméable qui, s'il n'est pas déchiré, masque l'enzyme à ses substrats habituels. Ce sac devait être appelé *lysosome* en 1955.

I.1.2. L'isolement des lysosomes et le contrôle de la séparation (14) (50) :

I.1.2.1. Les techniques de séparation des lysosomes :

Les difficultés de séparation de fractions cellulaires enrichies en lysosomes tiennent à la rareté, à la fragilité, à l'hétérogénéité de ces particules ainsi qu'au risque de contaminations par d'autres particules subcellulaires. L'association de l'activité phosphatasique acide aux lysosomes a permis d'introduire un schéma d'isolement par centrifugation fractionnée dont chaque étape peut être contrôlée par la détermination de l'activité de cette enzyme, *marqueur cellulaire* des lysosomes. Les premières expériences ont été effectuées sur des homogénats de foie de rat (4) (59).

L'homogénat traité par *centrifugation différentielle* conduit à l'obtention de quatre fractions isolées successivement en appliquant des vitesses de sédimentation croissantes. Ces fractions sont appelées N (nucléaires), M (mitochondriales lourdes), L (mitochondriales légères) et P (microsomales) respectivement. Dans l'expérience originelle, la fraction L renfermant plus de 40 % de l'activité phosphatasique acide et seulement 4 % de l'azote total constituait une fraction fortement enrichie en lysosomes. de DUVE (59) devait démontrer que la β -Glucuronidase, les cathepsines, la ribonucléase acide et la désoxyribonucléase acide

SÉPARATION DES LYSOSOMES PAR DIMINUTION DE DENSITÉ

(Technique au Triton WR-1339 – TROUET et LEIGHTON,1968)

ANIMAL : INJ. I.P. 85 mg TRITON WR. 1339/100 g (4 jours avant)

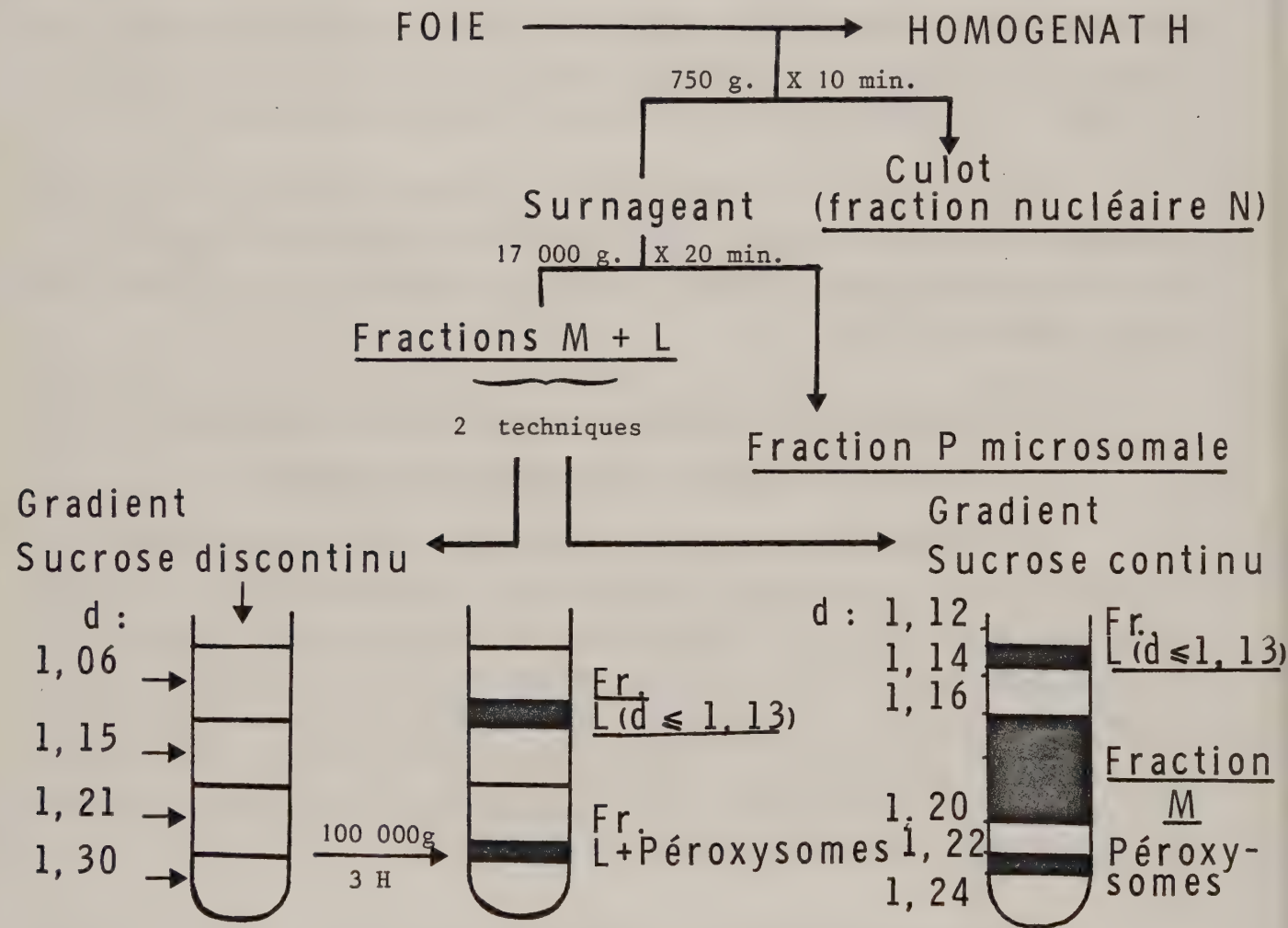


FIGURE 1

avaient la même distribution que la phosphatase acide et que toutes ces enzymes étaient donc localisées à l'intérieur des lysosomes.

La centrifugation en *gradient de densité* (centrifugation isopycnique) a également été largement employée. Le gradient couvre un intervalle de densité dont les limites se situent au-dessus et au-dessous de la densité d'équilibre des organites subcellulaires. Ceux-ci migrent donc en direction centrifuge ou centripète pour se rassembler dans la région où leur densité égale celle du milieu ambiant. Pour de petits organites comme les lysosomes, les champs centrifuges à appliquer doivent être élevés en raison de leur ralentissement à l'approche de la zone d'isopycnie. La découverte de WATTIAUX (236) sur la modification des propriétés physiques des lysosomes par le Triton WR-1339 a été mise à profit dans certains procédés de préparation (fig. 1) : ce détergent injecté à des animaux s'accumule dans les lysosomes en abaissant la densité à l'équilibre de ces particules de 1,21 à 1,12 environ. Le phénomène inverse observé avec le dextran-500 a été moins utilisé.

I.1.2.2. Les critères de pureté de la fraction cellulaire isolée :

Un fractionnement cellulaire n'étant jamais exactement identique à un autre, le contrôle de la fraction cellulaire isolée est une étape absolument indispensable. Différents critères peuvent être retenus pour contrôler des préparations enrichies en lysosomes :

- les critères biochimiques reposent sur l'évaluation de l'activité des enzymes marqueurs des lysosomes comme la phosphatase acide. Ce type de contrôle a été largement utilisé car l'approche du concept de lysosome fut presque exclusivement biochimique. Cependant, si l'activité d'un marqueur lysosomal est faible ou nulle, cela ne signifie pas obligatoirement que la fraction étudiée ne renferme pas de lysosomes ; il peut, en effet, y avoir inhibition ou inactivation de l'enzyme et lors du fractionnement l'enzyme peut avoir été libérée par rupture des sacs lysosomiaux.

La contamination de la préparation lysosomiale par d'autres particules doit être appréciée par la mesure des activités enzymatiques caractéristiques d'autres organites subcellulaires, par exemple la cytochrome-oxidase pour les mitochondries, la glucose-6-phosphatase pour les membranes microsomiales.

Mais les données biochimiques sont insuffisantes et elles doivent être complétées :

- les critères morphologiques et ultrastructuraux (15) ont permis de prouver la correspondance entre les lysosomes et les "corpuscules denses" décrits par NOVIKOFF en particulier :

. La microscopie électronique sur des fractions lysosomiales purifiées a permis de visualiser ces organites. Ils sont délimités par une *membrane unique* ce qui les différencie des mitochondries difficiles à éliminer des préparations lysosomiales mais qui possèdent une double membrane caractéristique.

. L'histochemie a donné une démonstration de la localisation lysosomiale d'un certain nombre d'enzymes : la phosphatase acide, la β -glucuronidase, l'arylsulfatase, la N-acétyl- β -glucosaminidase. Les conditions de fixation, le choix des substrats, l'adaptation des techniques au tissu étudié sont des facteurs essentiels pour l'obtention de résultats interprétables. La phosphatase acide est l'enzyme la plus couramment étudiée lorsqu'un examen histochemique des lysosomes est pratiqué ; les techniques utilisent le plus souvent la réaction de GOMORI (93) au β -glycérophosphate de sodium. La présence d'une activité phosphatasique acide a été démontrée dans les citernes du réticulum endoplasmique, dans l'appareil de GOLGI, dans les lysosomes primaires, dans les hétérolysosomes et dans les autolysosomes. L'existence de plusieurs isoenzymes a été démontrée.

I.1.3. Propriétés des lysosomes (50) (58) (158) :

Les lysosomes existent dans de nombreux tissus du règne animal et végétal. Leur nombre peut beaucoup varier d'une cellule à l'autre (de moins de dix à quelques centaines). Les bactéries n'en renferment pas car elles sont trop petites. La stabilité des lysosomes est maximale à un pH voisin de 6 à 7 ; au contraire, ils sont très labiles lorsqu'on les place à pH de 4 - 5.

Les lysosomes présentent une grande *hétérogénéité* :

- hétérogénéité physique : les études par centrifugation ont montré que la densité à l'équilibre de ces particules varie suivant les espèces et les tissus entre 1,15 et 1,39. Dans le foie de rat, deux populations de lysosomes ont été isolées : les "light lysosomes" (densité : 1,206) riches en phosphatase acide et en β -glucuronidase et les "heavy lysosomes" (densité : 1,221) riches en nucléases acides et cathepsines. Les cellules spléniques renferment trois populations lysosomiales.
- hétérogénéité morphologique : les lysosomes du rein ont un diamètre très variable compris entre 0,1 et 5 μ ce qui rend leur isolement très délicat. Les irrégularités et la diversité de la structure interne, les différences de taille,

de densité de ces organites s'expliquent par des changements dynamiques : ils se déforment, se joignent, se divisent, s'enrichissent en contenu grâce aux courants vésiculaires qui font converger les substrats vers eux.

- Hétérogénéité biochimique : la répartition qualitative et quantitative des enzymes lysosomiales peut varier. Dans les cellules hépatiques, l'histochimie a révélé une grande différence entre les cellules Kupfériennes (très colorées) et les cellules parenchymateuses (moins colorées). Le contenu enzymatique est influencé par les conditions physiologiques des cellules et, en particulier, par leur âge. Des lysosomes nouvellement formés possèdent une activité hydrolytique plus importante que de "vieux" lysosomes. Le contenu enzymatique est aussi étroitement lié au taux de synthèse des différentes enzymes, et ces taux de synthèse ne sont pas tous identiques entre eux.

Cependant, il est possible de trouver une unité dans toute cette hétérogénéité lysosomiale et cette unité est représentée par la *membrane*. Celle-ci est responsable de la latence des enzymes lysosomiales en réalisant une frontière nette entre un foyer très corrosif et une zone de cytoplasme sain ; il peut exister une différence de pH de 2 unités entre l'intérieur et l'extérieur de la membrane. La rupture de la membrane peut être obtenue par broyage mécanique, congélation-décongélation, l'action des détergents ou d'une solution hypotonique. Une blessure de la membrane permet aux substrats extérieurs à la membrane de pénétrer et aux enzymes intérieures de sortir avec de graves conséquences pour la cellule.

La structure membranaire conditionne un grand nombre des propriétés physiologiques des lysosomes en particulier le phénomène de *fusion des membranes*. Le modèle bimoléculaire de DANIELLI explique mal ce phénomène et il semble que la fusion nécessite une forte proportion de molécules phospholipidiques sous forme de configuration micellaire. La présence de phospholipases est responsable de la formation de lysolécithine à partir des lécithines ; or, l'introduction de lysolécithine dans les feuilletts membranaires bimoléculaires diminue la stabilité de ces feuilletts et augmente la formation de particules lipidiques globulaires qui favorise la fusion membranaire. En résumé, il semble que la fusion des lysosomes primaires avec la membrane cellulaire, la pinocytose et la fusion des lysosomes primaires avec des vacuoles digestives dépendent d'un seul évènement primaire : *l'élévation du pourcentage des lipides sous forme micellaire dans les membranes*.

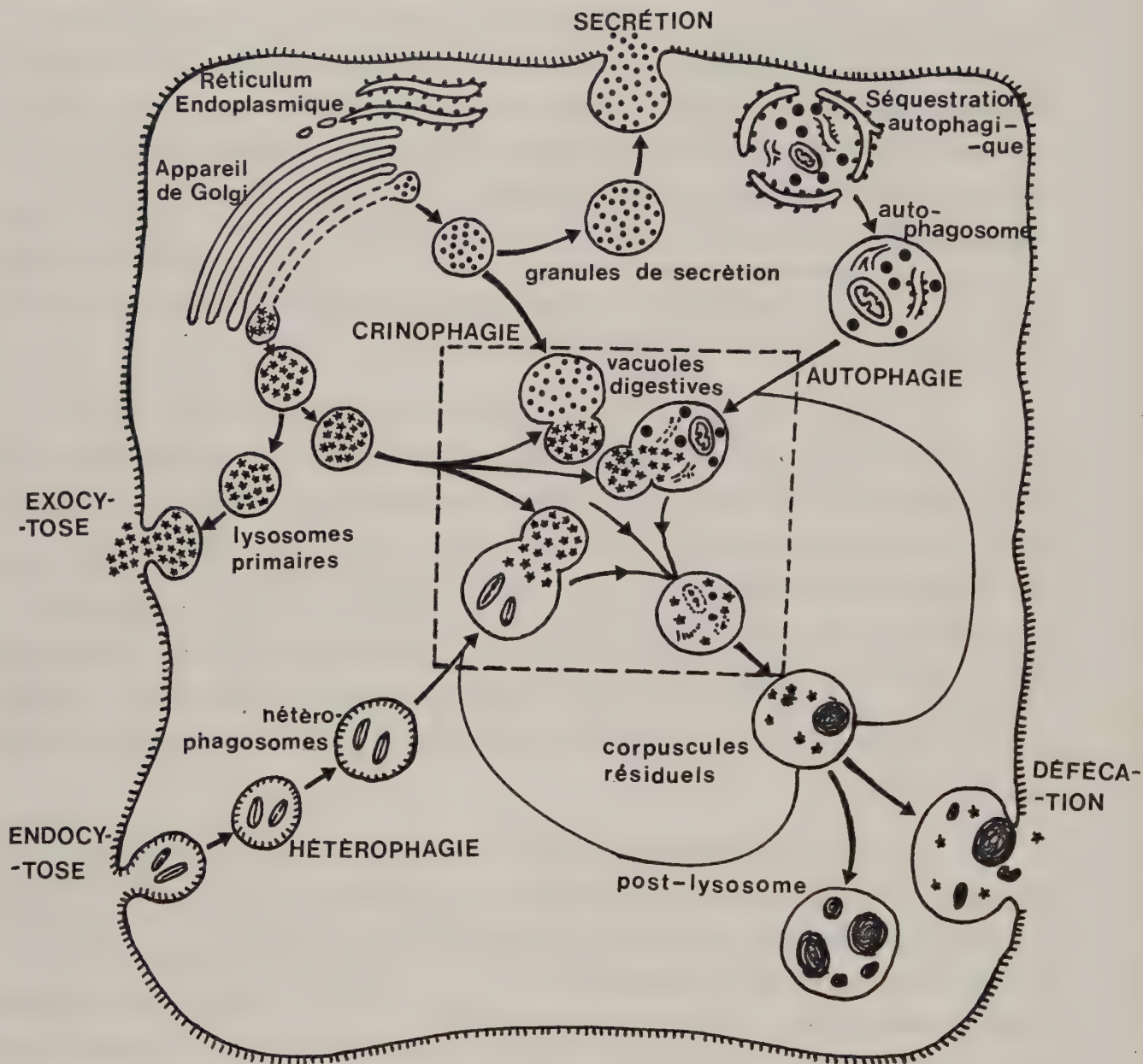


Fig. 2. La digestion lysosomiale
(repris de Hers et Van Hoof, 1973).
Les étoiles symbolisent les hydrolases acides.

I.1.4. La digestion lysosomiale (230) (232) :

Les lysosomes constituent un véritable estomac pour la cellule. La diversité de leur contenu enzymatique assure la digestion de presque toutes les substances existant dans l'organisme : protéines, polysaccharides, lipides, acides nucléiques.

La synthèse des hydrolases acides a lieu au niveau du réticulum endoplasmique, puis les enzymes sont concentrées dans l'appareil de GOLGI duquel se détachent des vésicules riches en enzymes : les *lysosomes primaires*. Dans des circonstances heureusement exceptionnelles, les lysosomes peuvent libérer leur contenu corrosif dans le milieu extracellulaire : c'est l'*exocytose*. Habituellement, les lysosomes primaires fusionnent avec des vacuoles renfermant des macromolécules, des bactéries ou d'autres cellules de l'organisme. Les structures sont alors rompues sous l'action des hydrolases en petites molécules : acides aminés ou dipeptides, mono - ou disaccharides, acides gras qui vont diffuser à travers la membrane lysosomiale. Ces lysosomes spécialisés dans la digestion sont appelés *secondaires*. Les lysosomes secondaires se chargent fréquemment de résidus qui peuvent être éliminés par le processus dit de *défécation*.

La digestion lysosomiale peut revêtir différents aspects (fig.2):

- l'autophagie : les lysosomes digèrent les constituants propres à la cellule. Il se forme au sein de la cellule un autophagosome qui renferme des mitochondries, de l'ergastoplasme, des éléments cytoplasmiques (glycogène par exemple) et qui est limité par un système de membranes provenant du réticulum endoplasmique. Ces membranes se réunissent ensuite pour constituer une membrane unique identique à celle des lysosomes. L'autophagosome en fusionnant avec un lysosome donne naissance à une vacuole digestive.
- l'hétérophagie : ce processus intéresse la digestion des substances qui ont pénétré dans le cytoplasme par endocytose. La capture de ces substances peut être très sélective grâce à l'existence de récepteurs spécifiques qui concentrent certains matériaux sur des membranes collectrices. Les hétérophagosomes formés se transforment en vacuoles digestives après fusion avec des lysosomes primaires ou secondaires.
- la crinophagie : c'est la fusion directe des grains de sécrétion avec un lysosome. Ce phénomène semble avoir un rôle important dans la régulation des fonctions sécrétoires.

Ce qui est remarquable, c'est la résistance de la membrane elle-même à la digestion lysosomiale grâce à une configuration particulière de la membrane interne. On imagine aisément les conséquences d'une altération de cette membrane sur le fonctionnement cellulaire du fait de l'action destructrice des enzymes lysosomiales.

Le phénomène de digestion peut faire l'objet d'une adaptation spécialisée en rapport avec le rôle particulier des cellules hôtes :

- . défense et nettoyage pour globules blancs et macrophages
- . réabsorption des protéines pour les cellules des tubes rénaux
- . invasion pour les spermatozoïdes
- . hormonogénèse pour la thyroïde
- . remaniement des os pour les ostéoclastes
- . métamorphose d'organes

I.2. LES ENZYMES LYSOSOMIALES

I.2.1. Propriétés générales des enzymes lysosomiales (51) (158) :

Toutes les enzymes lysosomiales connues actuellement sont des *hydrolases acides* qui exercent leur activité optimale à un pH compris entre 3,5 et 5. Ce sont des glycoprotéines (GOLDSTONE ET KOENIG, (92)) dont les résidus glucidiques renferment en particulier du mannose, du glucose et de la N-acétyl-glucosamine. Comme nous l'avons dit plus haut, ces enzymes d'une grande diversité réalisent la digestion intravacuolaire des macromolécules qui ont pénétré dans le lysosome soit par endocytose, soit par autophagie. La spécificité des hydrolases vis-à-vis de leurs substrats n'est généralement pas très étroite et le plus souvent, elles rompent un type de liaison quelle que soit la molécule dans laquelle cette liaison est engagée. Le rôle de ces enzymes est finalement de convertir leurs substrats en unités monomériques de telle sorte que ceux-ci soient utilisés à nouveau par la cellule pour la biosynthèse ou pour des réactions énergétiques.

Les enzymes lysosomiales sont-elles libres dans les lysosomes ou liées à la membrane de ces organelles ? de DUVE, lorsqu'il élaborait le concept de lysosome, pensait que les hydrolases acides étaient simplement enfermées dans un sac. En fait, il semble bien que certaines enzymes sont liées à la membrane alors que d'autres sont librement diffusibles à l'intérieur des lysosomes. La liaison membranaire pourrait faire intervenir l'acide sialique car la liaison disparaît après traitement par la neuraminidase ; des forces de nature électrostatique pourraient assurer cette liaison ; dans ce cas, la liaison serait faible et affectée par les conditions de pH et de force ionique. Le fait que l'autodigestion des hydrolases lysosomiales par les cathepsines ne se produit pas peut s'expliquer par une fixation étroite des enzymes à la membrane ; il n'y aurait alors accessibilité des enzymes lysosomiales que pour les substrats qui diffusent librement à l'intérieur des lysosomes.

L'existence d'*isoenzymes* a été prouvée pour de nombreuses hydrolases et en particulier pour les glucuronidases qui possèdent des résidus N-acétylneuraminique probablement responsables de leur hétérogénéité.

I.2.2. Classification des enzymes lysosomiales

Schématiquement, on distingue avec BARRETT (12) :

- 1). Les enzymes actives sur les liaisons ester (EC.3.1)
exemples : les phospholipases, les phosphatases acides, les arylsulfatases.
- 2). Les enzymes actives sur les composés glucosylés (EC.3.2)
Les exoglucosidases : α -glucosidase, β -glucosidase, α et β -galactosidase, α -mannosidase, N-acétyl- β -hexosaminidase, N-acétyl- α -glucosaminidase, β -glucuronidase, α -L-fucosidase, β -D-fucosidase.
Les endoglucosidases : les hyaluronidases, le lysozyme.
- 3). Les enzymes actives sur la liaison peptidique : les peptides hydrolases (EC.3.4)
exemple : les cathepsines.
- 4). Les enzymes actives sur la liaison C-N autre que la liaison peptidique (EC.3.5).
exemple : aspartyl-glucosylamine-amidase.

Une liste plus détaillée des enzymes lysosomiales a été dressée par TAPPEL (226) en 1969.

I.2.3. Synthèse et transport des enzymes lysosomiales :

La synthèse de la partie protéique des hydrolases acides (glycoprotéines) s'effectue sans aucun caractère particulier au niveau des ribosomes du réticulum endoplasmique rugueux ; puis, il y a transfert de la protéine dans l'espace cisternal du réticulum endoplasmique lisse où la *glucosylation* (encore mal connue) se réalise sous l'action de glucosyl-transférases. Celle-ci s'achève dans l'appareil de GOLGI ou dans une région du réticulum endoplasmique lisse appelée G.E.R.L. par NOVIKOFF (GOLGI endoplasmic reticulum lysosome). Les enzymes sont alors concentrées dans de petites vésicules entourées par une membrane ; ce "packaging" s'effectue par bourgeonnement à partir de l'appareil de GOLGI pour certains ou à partir du G.E.R.L pour NOVIKOFF. Donc, dès leur naissance, les enzymes lysosomiales se trouvent enfermées à l'intérieur d'une enceinte membraneuse qu'elles ne quittent que pour pénétrer dans une autre vacuole jusqu'à atteindre finalement les lysosomes primaires. Ceux-ci vont éventuellement fusionner avec des vacuoles de pinocytose, de phagocytose ou d'autophagie pour former des lysosomes secondaires.

Une autre hypothèse a été proposée par HICKMAN et NEUFELD (108) à la suite de leurs observations sur les fibroblastes en culture ; il s'agit de l'hypothèse de la *sécrétion-recaptation* des enzymes lysosomiales. Ces auteurs avancent que les hydrolases acides sont sécrétées à l'extérieur de la cellule par exocytose puis recaptées par endocytose grâce à des sites de reconnaissance membranaire de la cellule ; ces enzymes sont alors enrobées dans les lysosomes. Avant d'être sécrétées, les hydrolases acides doivent donc être équipées d'un "marqueur de reconnaissance" qui assure la liaison de l'enzyme aux récepteurs de la surface cellulaire. Cette théorie a été établie à partir de deux faits essentiels :

- des hydrolases acides introduites dans le milieu de culture sont englobées dans les fibroblastes par un mécanisme sélectif qui dépend d'un "marqueur de reconnaissance" sur l'enzyme et d'un récepteur sur les fibroblastes.
- les fibroblastes de certains mutants humains semblent manquer d'un "marqueur de reconnaissance" sur les hydrolases qui, dans ces conditions, restent localisées dans le liquide extracellulaire plutôt qu'à l'intérieur des lysosomes.

La sélectivité et l'efficacité de la capture de quelques enzymes hydrolytiques fut d'abord décrite pour l' α -L-iduronidase et ensuite pour un certain

nombre d'enzymes qui participent à l'hydrolyse des mucopolysaccharides, des glycoprotéines et des glycolipides.

La *sécrétion* des enzymes lysosomiales dans le milieu de culture des fibroblastes est généralement faible ; elle semble contrôlée par l'intégrité des microfilaments et des microtubules qui forment une sorte de "squelette" cytoplasmique. Certains auteurs étudiant les polynucléaires relient les phénomènes de sécrétion à une variation de perméabilité de la membrane cellulaire aux ions calcium. Cette augmentation de perméabilité induite par le facteur chimiotactique aboutit à une dégranulation des polynucléaires matérialisant la sécrétion des enzymes lysosomiales.

La *captation* des enzymes lysosomiales peut être étudiée expérimentalement sur des cellules mutantes qui présentent un déficit spécifique en hydrolase acide : si au milieu de culture, on ajoute l'enzyme déficitaire, on peut suivre l'augmentation intracellulaire de l'activité enzymatique et sa diminution dans le milieu de culture. Il est également possible de créer des déficits lysosomiaux intracellulaires grâce à la chloroquine qui, en se fixant sur la membrane cellulaire, inhibe la recaptation des enzymes.

Selon von FIGURA (235), deux types de pinocytose peuvent intervenir lors de la captation des hydrolases :

- la pinocytose passive qui dépend de la concentration de l'enzyme dans le milieu. Elle est peu efficace, non spécifique et discutée.
- la pinocytose active qui nécessite des récepteurs membranaires et des sites de reconnaissance sur les protéines enzymatiques. Elle est sélective, efficace, saturable et dépend de l'affinité de l'enzyme pour son récepteur membranaire. On peut ainsi distinguer des hydrolases à captation forte et des hydrolases à captation faible.

La nature des sites de reconnaissance a été précisée. L'oxydation périodique ménagée transforme la β -N-acétyl-hexosaminidase, enzyme à captation forte, en une enzyme à captation faible sans affectation de l'activité catalytique ce qui fait penser à des sites de reconnaissance glucidiques. La disparition des phénomènes d'endocytose active après l'action de la phosphatase alcaline sur les glucosidases associée aux résultats de l'inhibition compétitive par le

mannose-6-phosphate a conduit KAPLAN et coll.(130) à proposer un résidu glucidique phosphorylé (probablement le mannose-6-phosphate) comme site de reconnaissance des formes à captation forte de la β -glucuronidase, la β -hexosaminidase et de la β -galactosidase. D'une espèce à l'autre, les sites de reconnaissance peuvent être les mêmes.

Si la théorie de sécrétion-recaptation explique un grand nombre de phénomènes, elle ne permet pas cependant d'éclaircir un certain nombre de faits. Comment peut-on concevoir selon cette théorie que dans les mucopolipidoses de types II et III la mutation ne soit pas homogène au niveau des leucocytes, des hépatocytes, des neurones et des fibroblastes en culture ? Comment peut-on expliquer l'absence de correction des fibroblastes de glycogénose type II par coculture avec des fibroblastes normaux (REUSER, (191)) ? Il faut sans doute concevoir l'existence de plusieurs systèmes de reconnaissance et de plusieurs mécanismes de transport des hydrolases dans les lysosomes. LLOYD (154) à propos de la maladie I-cell, suppose qu'il y a recyclage des membranes après la pinocytose et qu'il existe une liaison plus ou moins importante des enzymes lysosomiales aux membranes.

En conclusion, malgré ses imperfections, la théorie de HICKMAN et NEUFELD a permis de définir des molécules enzymatiques à captation forte ou faible, et surtout d'introduire la notion de sélectivité dans la synthèse et le transport des enzymes lysosomiales par la description de site de reconnaissance sur l'enzyme et celle de récepteur sur les membranes cellulaires.

I.2.4. Les déficits en enzymes lysosomiales et le concept de maladie lysosomiale congénitale (105) (106) (232)

On définit une maladie lysosomiale congénitale comme une maladie causée par le déficit primaire d'une protéine lysosomiale soit structurale, soit enzymatique. Toutes les *maladies lysosomiales congénitales* actuellement connues sont dues au *déficit d'une enzyme lysosomiale*. Lorsque les hydrolases lysosomiales sont inactives ou absentes, il en résulte une *thésaurismose* avec accumulation intra-lysosomiale des molécules normalement dégradées par l'enzyme déficitaire. Les conséquences de ces déficits sont gravissimes. Sur le plan clinique, les atteintes observées sont nerveuses, cérébrales, cardiaques, ou musculaires et s'accompagnent fréquemment de malformations physiques. La mort survient le plus souvent en bas

âge. Pour VAN HOOFF (232), les critères permettant de classer une affection dans le groupe des maladies lysosomiales congénitales sont les plus suivants :

- cette maladie doit être une thésaurismose.
- diverses substances de dépôt s'accumulent dans les vacuoles lysosomiales.
- ces substances peuvent être détruites par un extrait de lysosomes normaux.
- une des enzymes nécessaire à la digestion de ces substances est absente congénitalement.

Le tableau I donne les caractéristiques des principales maladies lysosomiales.

Il faut noter que le matériel de surcharge intralysosomal peut être très hétérogène ; ceci est dû au fait que la plupart des enzymes lysosomiales ne sont pas spécifiques d'un type de molécule, mais seulement d'un type de liaison. L'hétérogénéité des dépôts intralysosomiaux est particulièrement frappante dans la gangliosidose à GM₁, la fucosidose et la mucosulfatidose. Elle pourrait exister dans la glycogénose type II. Il serait donc plus logique de classer ces maladies suivant le déficit enzymatique primaire car cette terminologie serait moins restrictive quant au matériel qui s'accumule à l'intérieur des lysosomes. L'accumulation secondaire de substances qui ne renferment pas la liaison chimique normalement hydrolysée par l'enzyme déficitaire vient parfois compliquer cette hétérogénéité ; c'est ainsi que des dépôts de cholestérol et de phospholipides sont observés, à côté des classiques dépôts de sphingomyéline, dans la maladie de NIEMANN-PICK.

Sur le plan morphologique, l'*hypertrophie des lysosomes* dans ces affections est constante, à l'exception de la maladie de KRABBE, et a une grande valeur diagnostique. Cependant, les dépôts ne sont pas entièrement intravacuolaires et sont parfois observés dans le cytoplasme : il peut s'agir d'artefact de préparations, mais il est certain que la saturation des lysosomes par le matériel devenu indigestible empêche la pénétration de nouvelles molécules qui restent donc à l'extérieur des lysosomes ; un éclatement des lysosomes peut survenir.

Les maladies lysosomiales congénitales se présentent comme des *maladies généralisées* puisqu'il existe peu de différences dans la nature des hydrolases lysosomiales en fonction du type de cellules étudiées ; le déficit enzymatique peut donc être mis en évidence dans de nombreux tissus : cerveau,

TABEAU I - LES PRINCIPALES MALADIES LYSOSOMIALES
d'après NEUFELD (177) et STRECKER (222)

MALADIE	DEFICIT ENZYMATIQUE	MATERIEL DE SURCHARGE
<u>I - LA GLYCOGENOSE TYPE II</u> • <u>Maladie de POMPE</u> typique • formes atypiques infantiles, juvéniles et adultes	• déficit en <u>α-1,4-glucosidase acide</u> dans presque tous les tissus	• <u>glycogène</u> dans presque tous les tissus. • présence d'un hétérosaccharide dans le muscle squelettique, le coeur et le cerveau.
<u>II - LES MUCOPOLYSACCHARIDOSES</u> • <u>type I</u> - type I_H : maladie de HURLER - type I_S : maladie de SCHIE - type $I_{H/S}$: double hétérozygote HURLER/SCHIE • <u>type II</u> - maladie de HUNTER • <u>type III</u> - maladie de SAN FILIPPO • <u>type IV</u> - maladie de MORQUIO • <u>type VI</u> - maladie de MAROTEAUX-LAMY • <u>type VII</u>	• déficit complet en <u>α-L-iduronidase</u> • déficit en <u>idurono-sulfate-sulfatase</u> • déficit en <u>héparane sulfate sulfatase</u> • déficit en <u>N-acétyl-α-D-glucosaminidase ?</u> • déficit en <u>α-D-glucosaminidase</u> • déficit en <u>N-acétylhexosamine 6-sulfate-sulfatase</u> • déficit en <u>β-galactosidase ?</u> • déficit en <u>N-acétyl-galactosamine-4-sulfate sulfatase</u> • <u>arylsulfatase B</u> • <u>β-glucuronidase</u>	• <u>dermatane sulfates, héparane sulfates</u> • <u>dermatane sulfates, héparane sulfates</u> • <u>héparane sulfates</u> • <u>kératane sulfates et chondroïtine-6-sulfates</u> • <u>dermatane-sulfates</u> • <u>héparane sulfates, dermatane sulfates, chondroïtine sulfates</u>
<u>III - LES GLYCOPROTEINOSES</u> • <u>Les sialidoses</u> - type A : mucopolipidose II, III - type B : mucopolipidoses I + observations isolées	• localisation subcellulaire inadéquate de certaines hydrolases. • déficit en <u>α-neuraminidase</u>	• augmentation des <u>sialosides urinaires</u> • très forte augmentation des <u>sialosides urinaires</u>

TABEAU I (suite) - LES PRINCIPALES MALADIES LYSOSOMIALES

MALADIE	DEFICIT ENZYMATIQUE	MATERIEL DE SURCHARGE
<u>La fucosidose</u>	. déficit en <u>α-L-fucosidase</u>	. augmentation des <u>fucosides</u> dans l'urine
<u>La mannosidose</u>	. déficit en <u>α-mannosidase</u>	. <u>mannosides</u>
<u>Aspartyl-glucosaminurie</u>	. déficit en 4-L- <u>aspartyl β-glucosylamine amidohydrolase</u>	. aspartyl-glucosamine dans le foie, le cerveau et l'urine.
<u>maladies qui sont à la fois des glycoprotéinoses et des sphingolipidoses (gangliosidoses à GM₁ et SANDHOFF).</u>		
<u>- LES SPHINGOLIPIDOSES</u>		
<u>Gangliosidose à GM₁</u> , formes infantiles (LANDING), formes juvéniles et autres types	. déficit en <u>β-galactosidase</u>	. <u>ganglioside à GM₁</u> + oligosaccharides + mucopolysaccharides
<u>Gangliosidose à GM₂</u>		
* maladie de TAY SACHS formes infantiles, juvéniles	. déficit en <u>β-hexosaminidase A</u>	. <u>ganglioside à GM₂</u>
* gangliosidose à GM ₂ variant 0 = maladie de SANDHOFF formes infantiles, juvéniles	. déficit en <u>β-hexosaminidase A + B</u>	. <u>ganglioside à GM₂</u> + oligosaccharides
<u>Leucodystrophie métachromatique (LDM)</u>	. déficit en <u>cérébroside sulfate sulfatase (arylsulfatase A)</u>	. (3'-sulfate) <u>galactosyl céramide</u>
cas infantiles tardifs, juvéniles et de l'adulte		
* mucosulfatidose (variant de LDM)	. déficit en <u>arylsulfatase A,B, et C</u>	. (3'-sulfate)galactosyl <u>céramide et autres sulfatides</u>
<u>Leucodystrophie à cellules globoides (maladie de KRABBE)</u>	. déficit en <u>cérébroside-β-galactosidase</u>	. diminution paradoxale du <u>galactosylcéramide</u> (galactosyl-cérébroside) dans la substance blanche avec cependant une élévation relative par rapport au sulfatide.
cas infantiles, juvéniles et tardifs.		
<u>Maladie de FABRY</u> nombreux variants	. déficit en <u>α-galactosidase A</u>	. <u>trihexosylcéramide</u> + digalactosylcéramide
<u>Lactosylcéramidase ?</u>	. déficit en <u>lactosyl-β-galactosidase ?</u>	. <u>lactosylcéramide</u>
<u>Maladie de GAUCHER</u>	. déficit en <u>cérébroside-β-glucosidase</u>	. <u>glucosylcéramide</u> (glucocérébroside)
<u>Maladie de NIEMANN-PICK</u> cas infantiles et juvéniles	. déficit en <u>sphingomyélinase</u>	. <u>sphingomyéline ou phosphorylcholine-céramide.</u>

foie, muscle, leucocytes, fibroblastes et urine. Cependant, l'importance du déficit varie beaucoup selon les cellules et dépend en particulier de la richesse du tissu en substrat que l'enzyme doit dégrader dans les conditions normales. La durée de vie des cellules intervient également et, des cellules à vie courte n'ont pas le temps d'accumuler beaucoup de matériel indigestible.

Au sein des maladies lysosomiales, la glycogénose de type II constitue le modèle historique. En effet, c'est la première affection qui fut reconnue comme étant due au déficit d'une enzyme lysosomiale : *l'alpha-1,4-glucosidase acide ou maltase acide*. (101).

CHAPITRE II

L'ALPHA-1,4-GLUCOSIDASE ACIDE (MALTASE ACIDE) (EC. 3.2.1.20)

II.1. HISTORIQUE

C'est grâce à l'étude de préparations de foie que devait être découverte la présence d'une activité maltasique dans les tissus animaux. L'enzyme était caractérisée par sa capacité de libérer du glucose à partir de maltose ou de glycogène (90) (195), ou de réaliser la transglucosylation (237) ou les deux propriétés simultanément (89)(221).

L'association de la maltase intestinale à des particules cellulaires, décrite par LARNER et GILLESPIE en 1956 (146) devait inciter LEJEUNE et coll (149) (150) à préciser la localisation de la maltase hépatique. Ces auteurs montraient à l'aide d'un fractionnement par centrifugation différentielle, que la propriété d'un homogénat de foie d'hydrolyser le maltose était liée aux fractions mitochondriales légères, microsomales et solubles. L'enzyme de la fraction mitochondriale légère était une *maltase acide* de même répartition subcellulaire que la *phosphatase acide lysosomiale*. Les deux autres fractions enzymatiques étaient des *maltases neutres*, la fraction microsomale suivant la répartition subcellulaire de la glucose-6-phosphatase. La latence de l'activité maltasique acide était également démontrée : l'activité enzymatique de préparations fraîches était faible, mais elle augmentait considérablement après congélation - décongélation, après exposition à la digitonine ou à une faible pression osmotique. Ainsi, était donnée la preuve de la localisation intralysosomiale de la maltase acide.

L'étude de l' α -1,4-glucosidase acide prenait un intérêt nouveau lorsqu'en 1963 HERS (101) démontrait l'absence d'activité enzymatique dans les tissus hépatiques, musculaires et cardiaques des enfants atteints de glycogénose de type II.

La purification de l'enzyme était alors entreprise par de nombreux auteurs afin d'en préciser les propriétés et le rôle physiologique. Dans ce chapitre, nous résumons les différents travaux consacrés à la maltase acide après avoir donné les caractéristiques générales des α -1,4-glucosidases.

II.2. GENERALITES SUR LES ALPHA-1,4-GLUCOSIDASES

II.2.1. Définition

Les α -1,4-glucosidases sont des *exoenzymes* qui libèrent des unités α -D-glucose à partir des chaînes non réductrices d' α -glycans allant des disaccharides aux polysaccharides.

II.2.2. Classification

Il est pratique de classer les α -1,4-glucosidases selon leur pH optimum d'activité. Les α -glucosidases dites "*neutres*" ont un pH optimum compris entre 6 et 7 alors que les α -glucosidases "*acides*" ont un pH optimum compris entre 4 et 5. Comme nous l'avons déjà signalé, la maltase neutre est de localisation microsomale alors que la maltase acide est intralysosomiale (150).

II.2.3. Spécificité

Bien qu'elles soient couramment appelées *maltases*, ces enzymes ont une spécificité non limitée à la seule hydrolyse du maltose. En particulier, la maltase acide de foie de rat peut convertir totalement le glycogène en glucose (125). Une telle dégradation met en jeu les propriétés d'une α -1,4-glucoside-glucohydrolase (EC.3.2.1.20), d'une α -1,6-glucoside-glucohydrolase et d'une α -glucoamylase (α -1,4-glucan glucohydrolase, EC.3.2.1.3).

De plus, la maltase acide catalyse des réactions de transglucosylation(237)

La maltase neutre ne dégrade pas les polysaccharides (glycogène, dextran) mais seulement les oligosaccharides.

II.2.4. Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action des glucosidases est encore très mal connu. A l'aide d'oxygène marqué (^{18}O), CAPON (36) a montré que la scission se produisait entre le carbone 1 et l'oxygène glucosidique en mettant en jeu des substitutions nucléophiles.

II.3. PURIFICATION DE L' α -1,4-GLUCOSIDASE ACIDE ET PROPRIETES DE L'ENZYME PURIFIEE

II.3.1. L' α -1,4-glucosidase acide des plantes, des bactéries et des champignons.

Les enzymes qui hydrolysent les liaisons α -glucosidiques sont largement distribuées dans la nature. Les extraits de plantes, de protozoaires, de bactéries, de champignons, d'invertébrés et de vertébrés en renferment (145).

Les plantes supérieures possèdent une activité maltasique comme l'ont décrit JORGENSEN et coll. (128,129) à propos de l'*orge malté*. Cette enzyme, ainsi que celle de la farine de sarrasin est capable d'hydrolyser à la fois le maltose et l'amidon. A pH 4,6, l' α -glucosidase de l'orge est inhibée de manière compétitive par le Tris et l'érythritol. D'autres polyols, en particulier le xylitol et le D-arabitol peuvent inhiber l'enzyme de l'orge (132). HUTSON et MANNERS (121) ont étudié l'hydrolyse des α -glucosides dans les extraits de onze plantes (tomate, carotte, petits pois, pomme de terre, ...) et en particulier dans l'*alfalfa*. Le maltose et le nigérose sont hydrolysés par ces extraits. L'inhibition par le turanose, inhibiteur compétitif, semble prouver que le maltose et le nigérose sont hydrolysés à des sites catalytiques différents dans l'*alfalfa*. Les préparations de cette plante ont également une activité isomaltasique. *Le riz* (225) renferme deux α -glucosidases qui sont actives sur le maltose et l'amidon à un pH voisin de 4. Les sites catalytiques pour ces deux substrats seraient distincts. L'activation par le chlorure de potassium n'est observée que sur l'hydrolyse de l'amidon et l'activation maximale est obtenue avec une concentration en chlorure de potassium de 50 mM. L'enzyme de riz catalyse la transglucosylation in vivo et in vitro. Très récemment, YAMASAKI et coll. (246) viennent d'isoler, avec un rendement de 5 %, l' α -glucosidase du fruit de *Lentinus edodes* après une précipitation au sulfate d'ammonium, une chromatographie sur DEAE-cellulose et une focalisation isoélectrique préparative. Le poids moléculaire de l'enzyme est de 51.000. Son pH optimum d'activité est de 5 avec le maltose comme substrat. Les auteurs ont isolé parallèlement une glucoamylase (P.M = 55.000) qui serait distincte de l' α -glucosidase. En particulier, l'action des deux enzymes sur l'amylase est différente, l' α -glucosidase libérant de l' α -glucose et la glucoamylase du β -glucose.

Les bactéries ont également été étudiées, comme par exemple *Bacillus cereus* (243). L' α -glucosidase de ce bacille est une maltase neutre (pH optimum d'activité de 6,9) et son poids moléculaire a été évalué à 12.000 ; rappelons en effet, que les bactéries ne renferment pas de lysosomes; néanmoins, l'espace

périplasmique entre la paroi externe et la membrane cytoplasmique de la bactérie pourrait jouer un rôle analogue.

Les α -glucosidases des champignons ont fait l'objet de nombreux travaux en tant que modèle d'enzymes inductibles. Les α -glucosidases des *Saccharomyces* sont des maltases neutres avec un pH optimum pour l'hydrolyse du maltose de 6,7 pour *Saccharomyces italicus* (98) et de 7,2 pour *Saccharomyces cerevisiae* (134). La levure de bière (*Saccharomyces carlsbergensis*) comporte trois sortes d' α -glucosidases dont le pH optimum est compris entre 6,3 et 7,1 (167).

L' α -glucosidase de *Penicillium oxalicum* a été isolée par chromatographie sur DEAE-cellulose et sur SP-Sephadex C-50 (245). Le pH optimum de l'enzyme purifiée est très acide (3,5) avec le maltose comme substrat. L'enzyme hydrolyse de nombreux sucres : le maltose, le maltotriose, le phényl- α -maltoside, l'isomaltose, le panose, l'isomaltotriose, l'amylose et l'amidon soluble en libérant du glucose. La transglucosylation en présence de maltose est également possible. Le mycélium de *Penicillium purpurogenum* renferme une α -1,4-glucosidase acide de poids moléculaire 120.000 et de point isoélectrique 3,2 (244). Son pH optimum est de 3,0 à 5,0 avec le maltose comme substrat. L'enzyme hydrolyse également l'amylose, l'amylopectine, le glycogène et l'amidon soluble ; elle possède une activité α -glucosyl-transférase, le principal produit de transfert à partir du maltose étant le maltotriose.

L' α -glucosidase de *Mucor javanicus* a été obtenue sous forme cristallisée (241) après différentes étapes de purification : extraction de l'enzyme à partir des mycélium par l'urée, fractionnement à l'acétone et au polyéthylène glycol 6000, séparation sur Séphadex G-200 et DEAE-cellulose et enfin cristallisation par addition d'ampholine. L'enzyme hydrolyse le maltose, le méthyl- α -maltoside, le phényl- α -maltoside et l'amidon soluble en libérant du glucose (242). L'enzyme catalyse la transglucosylation à partir du maltose sur la riboflavine, la pyridoxine, l'esculine et la rutine. Le Tris et le turanose inhibent l'activité enzymatique. L'activité enzymatique est étroitement reliée à un résidu histidine dans le centre actif.

Nous ne pouvons conclure ce paragraphe sans donner quelques caractéristiques de l' α -glucosidase d'*Aspergillus niger* qui, nous le verrons, a été très utilisée dans les essais de thérapeutique substitutive de la glycogénose de type II. *Aspergillus niger* produit plusieurs enzymes qui ont la capacité d'hydrolyser les

liaisons α -D-1,4-glucosidiques de l'amidon et des malto-oligosaccharides. PAZUR et ANDO (185) sont parvenus à purifier une amyloglucosidase d'*Aspergillus niger* par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-cellulose. Cette amyloglucosidase convertit en glucose l'amidon à 95 %, l'amylose à 93 %, l'amylopectine à 98 % et l'amyloextrine à 92 %. L'enzyme est également très active sur le maltose, mais elle ne réalise pas la transglucosylation, alors que la préparation non purifiée d'*Aspergillus niger* renferme une maltase possédant une activité transférase. Le pH optimum de l'activité amyloglucosidasique testée sur l'amidon est de 4,8. L'inactivation par la chaleur (30 minutes à pH 4,8) est de 20 % à 50°C et de 58 % à 60°C.

TSUJISAKA et FUKUMOTO (229) ont obtenu une α -glucosidase d'*Aspergillus niger* cristallisée qui hydrolyse faiblement l'isomaltose mais qui n'a aucune activité sur l'amidon soluble.

II.3.2. L' α -1,4-glucosidase acide animale et humaine

II.3.2.1. techniques de purification

Après la preuve apportée par HERS en 1963 du déficit en maltase acide dans la glycogénose de type II, la maltase acide a fait l'objet de nombreuses recherches et des méthodes de purification de cette enzyme ont été très rapidement publiées.

En dehors de l'espèce humaine, la maltase acide est rencontrée dans les tissus de très nombreux animaux (rat, lapin, chien, porc, boeuf, ...). L'activité enzymatique la plus élevée est localisée au niveau de la rate. Le foie, les reins, le coeur, le cerveau, les poumons renferment une activité importante. C'est dans le muscle que la concentration de l'enzyme est la plus faible.

En 1964, ROSENFELD (193) décrit la purification d'une " γ -amylase" (qui semble bien être une maltase acide) à partir des foies et des reins de *Lapins* selon le procédé dit "éthanol-amidon". Les tissus homogénéisés en présence d'acétone sont amenés à l'état de poudre qui est extraite par un tampon acétate pH 4,8. La préparation est traitée par l'éthanol à 96% qui précipite des polysaccharides et des protéines inactives. Une solution d'amidon de pomme de terre ajoutée au milieu permet l'adsorption de l' α -amylase. L'amidon est éliminé par centrifugation et le surnageant traité à nouveau à l'éthanol à 96%. Le précipité obtenu après centrifugation est dissous dans le tampon acétate pH 4,8, dialysé et chauffé à 55°C. Le surnageant de centrifugation est appliqué sur une colonne de carboxy-

méthylcellulose ; l'élution est effectuée à l'aide du tampon acétate. Les fractions éluées, actives du point de vue enzymatique, sont concentrées. Le rendement final de la purification est bas.

Cette technique est cependant améliorée par IWANOWSKI et GANDRYA (123) qui introduisent la congélation - décongélation au cours de l'isolement de la "γ-amyrase" de *muscle de lapin*. Le rendement d'extraction est multiplié par dix par rapport à la méthode précédente.

En 1964, TORRES et OLAVARRIA (228) purifient 27 fois l'α-glucosidase acide de *foie de chien* avec un rendement de 2,6%. Cinq étapes successives sont effectuées :

- homogénéisation du tissu
- précipitation à l'acide acétique
- précipitation au sulfate d'ammonium entre 30 et 60% de saturation
- adsorption sur gel de phosphate de calcium
- chromatographie sur une colonne de DEAE-cellulose et élution par un tampon phosphate pH 7,5 renfermant du chlorure de sodium dont la concentration augmente de 15 à 250 mM au cours de l'élution.

Deux pics d'activité I et II sont obtenus : le pic I apparaît lors de l'élution par NaCl 25 mM et le pic II pour NaCl 110 mM ; le premier pic correspond à l'α-glucosidase acide et le second à l'α-glucosidase neutre.

En 1967, AURICCHIO et SICA (6) introduisent la gel-filtration sur Séphadex G-100 dans la purification de la maltase acide de *foie de rat*. Ces auteurs avaient eu l'idée d'utiliser la faible activité dextranase de la maltase acide pour sa purification. En effet, ils pensaient que l'enzyme devait être retardée dans son élution sur Séphadex, polymère ramifié de l'α-glucose, par une liaison avec ce gel de type enzyme-substrat. Il s'agissait, en fait, d'une chromatographie d'affinité particulière, le Séphadex étant un analogue des substrats naturels de l'enzyme. Les résultats montrèrent que l'α-1,4-glucosidase acide était effectivement retardée sur Séphadex et pouvait ainsi être séparée des autres protéines et, en particulier, de la maltase neutre qui est dépourvue d'activité dextranase. Cette découverte devait considérablement améliorer les rendements de l'isolement de l'α-1,4-glucosidase acide. Par cette technique, AURICCHIO et SICA (6) purifient 700 fois la maltase acide du foie de rat avec un rendement de 20 %.

La même année, l'enzyme de *rein humain* est purifiée (7) 500 fois avec un rendement de 20 %.

En 1968, ces mêmes auteurs (8) améliorent la purification en traitant l'homogénat de foie ou de rein à l'acide acétique, puis au sulfate d'ammonium. Après la chromatographie sur Séphadex, AURICCHIO préconise un passage des fractions purifiées sur colonne de Bio-Gel. Par chromatographie sur Bio-Gel, gel de polyacrylamide, l' α -1,4-glucosidase acide n'est pas retardée et peut ainsi être séparée des petites molécules contaminantes qui sont éluées en même temps que l'enzyme sur les colonnes de Séphadex.

Le meilleur rendement obtenu par les chercheurs italiens est de 43 % lors de la purification de la maltase acide du *foie de boeuf* à l'aide de trois chromatographies successives (Séphadex G-100, Bio-Gel P60, Séphadex G-100) (31).

En 1968 également, un schéma de purification tout à fait différent est proposé par FUJIMORI et coll. (82) à partir de la *rate de bovidés*. Le tissu est homogénéisé dans un tampon acétate pH 4,8, puis fractionné par des précipitations successives au sulfate d'ammonium, à l'isopropanol, à l'éthanol et à l'acétone. Ces opérations sont suivies de chromatographies sur gel de phosphocellulose, puis de DEAE-Séphadex A50. Par addition d'acétone, l'enzyme est obtenue à l'état cristallisé ; elle est alors purifiée 2400 fois avec un rendement de 8,9 %.

En 1970, JEFFREY (125) après avoir séparé les lysosomes de *foie de rat* selon le procédé d'APPELMANS et coll. (4) isole l' α -1,4-glucosidase acide par précipitation de l'homogénat lysosomal au sulfate d'ammonium, suivie de chromatographies sur Séphadex G-100 et DEAE-cellulose.

Une année plus tard, PALMER (183) purifie 3500 fois l'enzyme de *muscle de lapin* selon le procédé de AURICCHIO et coll. (6).

En 1972, l'enzyme humaine placentaire est purifiée 10400 fois par de BARSY et coll. (54) à partir de 400 g de résidus placentaires. L'homogénat est acidifié à pH 3,8 - 4,0 puis précipité au sulfate d'ammonium. L'échantillon est appliqué sur une colonne de Séphadex G-100. Après la sortie du pic de protéines, l'élution de la maltase acide est facilitée par l'utilisation d'une solution éluante renfermant 0,25 % de maltose. L'enzyme humaine est plus retardée sur la colonne que l'enzyme de *foie de rat* également isolée par de BARSY et coll. (54).

Enfin, la purification de l'enzyme de *foie humain* est décrite en 1975 par BELENKY et ROSENFELD (17), en 1976 par KOSTER et coll. (142) et en 1978 par MURRAY et coll. (172). BELENKY et ROSENFELD utilisent la technique de BRUNI et coll. (31) avec une modification intéressante : ils introduisent dans la solution éluante du méthyl- α -D-glucopyranoside, inhibiteur compétitif de l' α -glucosidase acide, pour permettre une élution rapide de l'enzyme liée au gel de dextran (Séphadex 150). Les mêmes auteurs avaient déjà mis en oeuvre cette technique pour purifier l'enzyme de *foie de lapin* et de *rate de porc* (194). KOSTER réalise une chromatographie sur Séphadex selon la technique de AURICCHIO et coll. (8) suivie d'une purification sur DEAE-cellulose. Le rendement est faible (2,9%). MURRAY, BROWN et BROWN (172) obtiennent un bien meilleur rendement de purification (41 %) après une séparation sur Séphadex G-100.

Nous avons rassemblé dans le tableau II (page suivante) les différents schémas proposés pour la purification de la maltase acide animale et humaine.

II.3.2.2. Propriétés de l'enzyme purifiée

II.3.2.2.1. Propriétés physico-chimiques

— Constantes de sédimentation et de diffusion

Les constantes de sédimentation et de diffusion ont été mesurées pour l' α -1,4-glucosidase acide de foie de rat, de foie de boeuf et de rein humain. Les résultats sont présentés dans le tableau III.

TABLEAU III

CONSTANTES DE SEDIMENTATION ET DE DIFFUSION
DE L' α -1,4-GLUCOSIDASE ANIMALE ET HUMAINE

	Foie de rat AURICCHIO et coll.(8) 1968	Rein humain AURICCHIO et coll.(8) 1968	Foie de boeuf BRUNI et coll. (3) 1969	Foie humain BELENKY et coll.1975(17)
<u>Constante de sédimentation</u>	:	:	:	:
standard albumine	4,9S et 5,0S	5,6 S	:	:
standard glycéraldéhyde	5,1S	:	:	:
3-phosphate déshydrogénase	:	:	:	:
S° ₂₀ , w	:	:	5,7 S	:
non précisé	:	:	:	5,4 S
<u>Constante de diffusion</u>	:	:	:	:
D _{20,w} X 10 ⁻⁷ cm ² X sec. ⁻¹	:	:	4,7	:
	:	:	:	:

TABLEAU II

SCHEMA DE PURIFICATION DE LA MALTASE ACIDE ANIMALE ET HUMAINE

ETAPES DE LA PURIFICATION	AUTEURS	TORRES et OLAVARRIA (1964)	AURICCHIO et SICA (1967)	AURICCHIO : AURICCHIO et BRUNI : (1967)	AURICCHIO et coll (1968)	FUJIMORI et coll.(1968)
	SOURCES	Foie de chien	Foie de rat	Rein humain	Foie de rat : Rein humain	Rate de bovidé
Homogénat		5,3 U/g*	+	+	0,9U/g : 21 U/g	13,7 U/g
Isolement de fraction lyso- somiale (L)		0	0	0	0 : 0	0
Précipitation acide à pH = 4,2		12 U/g	0	0	5,15U/g : 25 U/g	0
Précipitation au sulfate d'ammonium (30 - 60 % saturation)		14,3 U/g	0	0	7 U/g : 122 U/g	80 (33-55% sat. U/g(NH ₄) ₂ SO ₄)
Précipitation à l'éthanol		0	0	0	0 : 0	705 U/g
Précipitation à l'acétone		0	0	0	0 : 0	3492 U/g
Adsorption sur gel de phos- phate de calcium		40,6U/g	0	0	0 : 0	0
Chromatographie sur phos- phocellulose		0	0	0	0 : 0	8524 U/g
Chromatographie sur DEAE - Séphadex - A50		0	0	0	0 : 0	21758 U/g
1ere chromatographie Séphadex G100		0	+	+	5520 U/g : 4800 U/g	0
Chromatographie sur DEAE - cellulose		145,5U/g (pic I)	0	0	0 : 0	0
Chromatographie sur Bio-Gel P60		0	0	0	non effectuée mais étudiée	0
2e chromatographie sur Séphadex G100		0	0	0	0 : 0	0
Lyophilisation		0	0	0	0 : 0	0
Cristallisation		0	0	0	0 : 0	32320 U/g
PURIFICATION (Activité enzyme purifiée) (Activité de l'homogénat)		27	700	500	6130 : 228	2360
RENDEMENT		2,6 %	20 %	20 %	7 % : 19 %	8,9 %

* : Les activités enzymatiques sont exprimées en activité spécifique c'est-à-dire en unités par gramme de protéines.
Une unité enzymatique est la quantité d'enzyme qui hydrolyse une micromole de maltose par minute dans les conditions des réactions décrites par les différents auteurs.

TABLEAU II (suite)

BRUNI et coll. (1969)	JEFFREY et coll. (1970)	PALMER (1971)	DE BARSY et coll. (1972)	KOSTER et coll. (1976)	MURRAY et coll. (1978)
Foie de boeuf	Foie de rat	Muscle de lapin	Foie de rat : Placenta humain	Foie humain	Foie humain
6,8 U/g	1,47 U/g	1,75 U/g	1,6 U/g : 0,7 U/g	6,2 U/g	13,6 U/g
0	+6,3 U/g	0	+18 U/g : 0	0	0
20 U/g	0	2,19 U/g	0 : 23 U/g (pH: 3,8-4)	38 U/g	0
25 U/g	50,8 U/g (42-84 % sat.) (NH ₄) ₂ SO ₄	5,04 U/g	90 U/g ^{***} : 27 U/g ^{***}	53 U/g	163 U/g (33-55% sat.) (NH ₄) ₂ SO ₄
0	0	0	0 : 0	0	0
0	0	0	0 : 0	0	0
0	0	0	0 : 0	0	0
0	0	0	0 : 0	0	0
0	0	0	0 : 0	0	0
425 U/g	188 U/g	6167 U/g	21500 U/g : 7300 U/g	8700 U/g	32700 U/g
0	6233 U/g	0	0 : 0	13200 U/g	0
926 U/g	0	0	0 : 0	0	0
34000 U/g	0	0	0 : 0	0	0
0	7730 U/g	0	0 : 0	0	0
0	0	0	0 : 0	0	0
5000	1220 (exprimé par rapport à la fraction L)	3520	13400 : 10400	2100	2400
43 %	13 % (exprimé par rapport à la fraction L)	22 %	20 % : 30 %	2,9 %	41 %

*** : La précipitation au sulfate d'ammonium est réalisée par addition de 370 g de sel par litre d'extrait lysosomal pour l'enzyme de rat et de 500 g de sel par litre de surnageant acide pour l'enzyme humaine placentaire.

— Poids moléculaire et sous-unités

Le *poids moléculaire* de l'enzyme purifiée a été déterminé par différentes techniques :

- l'équilibre de sédimentation à haute vitesse selon la technique de déplétion du ménisque d'YPHANTIS.
- l'équilibre de sédimentation à basse vitesse (VAN HOLDE et BALDWIN (231))
- la centrifugation en gradient linéaire de sucrose (MARTIN et AMES (163))
- l'utilisation de l'équation de SVEDBERG après détermination des constantes de sédimentation S et de diffusion D.
- l'électrophorèse en gel de polyacrylamide, soit à différentes concentrations de polyacrylamide (méthode de HEDRICK et SMITH (99)), soit en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS).

Le tableau IV rassemble les valeurs obtenues dans la littérature.

TABLEAU IV

POIDS MOLECULAIRE DE L' α -1,4-GLUCOSIDASE
ACIDE ANIMALE ET HUMAINE

Auteurs	Sources de l'enzyme	Technique utilisée	Résultats
RICCHIO et coll.(8) (68)	Foie de rat	gradient de sucrose	76.000 à 83.000
	Rein humain	gradient de sucrose	97.000
NI et coll.(31) (69)	Foie de boeuf	équation de SVEDBERG (à partir de S et D)	108.000
		équilibre de sédimenta- tion à grande vitesse	103.000
		équilibre de sédimenta- tion à faible vitesse	109.000
FREY et coll.(125) (70)	foie de rat	équilibre de sédimenta- tion à grande vitesse	107.000 à 111.000
		gradient de sucrose	113.000 à 115.000
NTART (139) (3)	placenta humain	électrophorèse en SDS	112.000
		BioGel P-150	108.000
RAY et coll.(172) (78)	foie humain	BioGel P-200	110.000 à 111.000

L'existence de sous-unités devait être envisagée en raison du poids moléculaire élevé de l'enzyme. BRUNI et coll. (32) ne parviennent pas à dissocier l' α -glucosidase du foie de boeuf par acylation (anhydride succinique) ou alcalinisation (potasse pH 10,5) ; cependant, le traitement par un mélange renfermant de la guanidine 5 M permet la dissociation de l'enzyme avec une perte d'activité de 90 %. L'analyse par ultracentrifugation en milieu guanidine - HCl 5 M décèle la présence, en quantité importante, d'une unité légère de constante de sédimentation 1,8 S. Le poids moléculaire de cette unité est voisin de 25.000 (détermination par gel-filtration sur Séphadex et par la technique d'YPHANTIS).

Une protéine de poids moléculaire 50.000 ± 5.000 est parfois présente ; il pourrait s'agir du produit d'une dissociation incomplète. BRUNI et coll.(32) pensent donc que l'enzyme serait constituée de *quatre sous-unités* de poids moléculaire identique (26.000) reliées par des liaisons non covalentes. QUINTART (189) détecte également une sous-unité, de poids moléculaire 25.000, en étudiant l'enzyme placentaire (P.M = 112.000). Ces résultats sont également en faveur d'une structure tétramérique pour l' α -1,4-glucosidase acide placentaire.

Les travaux de BELENKY et ROSENFELD (16) sur l' α -glucosidase acide de *foie de lapin* mettent en évidence deux sous-unités en présence d'urée 3M et quatre sous-unités en présence d'urée 6M. L'urée 3M inhibe complètement le pouvoir hydrolytique de l'enzyme vis-à-vis du glycogène alors que l'hydrolyse du maltose n'est diminuée que de 50 %. L'effet de l'urée est réversible et les propriétés de la maltase acide sont restaurées après élimination de l'urée par dialyse. La dissociation en présence d'urée 3M n'est pas retrouvée pour l'enzyme de *foie humain* (17). La maltase de foie humain traitée par le réactif guanidine - HCl 5M ne conduit qu'à un seul composé de constante de sédimentation 2,2 S qui correspond probablement à une sous-unité. L'électrophorèse de l'enzyme hépatique humaine en gel de polyacrylamide renfermant 1 % de SDS montre la présence de trois composés de poids moléculaires différents. L'analyse des amino-acides N-terminaux de ces trois composés par dansylation révèle la présence d'alanine, de glycine et d'acide glutamique respectivement.

MURRAY et coll.(172) après avoir traité l'enzyme de foie humain à 100°C par le mélange 1 % SDS - 1 % 2-mercaptoéthanol pendant cinq minutes, obtiennent deux bandes correspondant à des poids moléculaires de 87.000 et 76.000. MURRAY et coll. tentent d'expliquer la différence entre le poids moléculaire (110.000) et

la somme des poids moléculaires des deux sous-unités (165.000) par l'influence des hydrates de carbone dans la protéine. Ceux-ci entraînent souvent des anomalies du comportement des protéines lors de la détermination du poids moléculaire.

En résumé, il est certain que la molécule d' α -1,4-glucosidase acide possède des sous-unités, mais il est encore impossible de définir avec certitude leur nombre, leur poids moléculaire et la manière dont est réalisé leur assemblage.

— Point isoélectrique

Le point isoélectrique de l'enzyme purifiée à partir de placenta humain est égal à 4,6 (55).

BELENKY et ROSENFELD (17) ont étudié la maltase acide purifiée du *foie humain* par focalisation électrique en colonne : une seule bande enzymatiquement active est présente, elle possède un point isoélectrique de 4,58 - 4,6.

En 1978, MURRAY et coll.(172) effectuent également une focalisation électrique (en gel de polyacrylamide) sur l'enzyme purifiée de foie humain. Par cette technique, les fractions éluées à partir du gel de Séphadex se révèlent comme un mélange de quatre à cinq isomères dont les points isoélectriques sont compris entre 4,44 et 4,66.

— Composition en acides aminés et titrage des groupements thiol

BRUNI et coll.(31) ont déterminé la composition en acides aminés de l' α -1,4-glucosidase acide de foie de boeuf après hydrolyse de l'enzyme purifiée par l'acide chlorhydrique 6N à 106°C (tableau V). QUINTART (189) trouve une certaine similitude entre la composition en acides aminés de l'enzyme placentaire humaine et celle de l'enzyme de foie de boeuf. L' α -1,4-glucosidase acide humaine présente cependant, un pourcentage de résidus acides (acides glutamique et aspartique) et basiques (lysine - histidine) plus élevé que l'enzyme bovine.

BRUNI et coll.(31) ont réalisé le *titrage des groupements thiol* sur l'enzyme de *foie de boeuf* par la technique d'ELLMAN à l'acide 5,5'dithiobis-2-nitrobenzoïque (71). En milieu aqueux, un seul groupement -SH par molécule est détecté alors qu'en milieu guanidine 6 M quatre groupements sont mis en évidence. Huit demi-cystine par molécule avaient été trouvées lors de l'analyse des aminoacides. Cependant, comme il n'existe pas de méthode spécifique pour déterminer le contenu en cystéine, le nombre de ponts -S = S- dans la molécule n'est pas connu.

TABLEAU V
COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE L' α -1,4-GLUCOSIDASE ACIDE
DE FOIE DE BOEUF [BRUNI et coll. (31)]

Acide aminé	Temps d'hydrolyse			Moyenne ou valeur extrapolée	Nombre de résidus pour un poids molé- culaire de 107.000
	22H	48H	72H		
Lysine	8,3	8,4	9,7	8,8	9
Histidine	10,0	11,0	12,4	11,1	12
Arginine	24,9	26,0	26,5	25,8	28
Acide aspartique	53,6	48,0	50,5	50,7	54
Thréonine	44,0	41,8	40,9	46,3	49
Sérine	37,2	34,2	32,1	40,4	43
Acide glutamique	59,2	57,1	59,2	58,5	63
Proline	47,0	43,1	46,1	45,4	49
Glycine	44,6	42,5	44,8	44,0	47
Alanine	39,0	37,4	39,3	38,6	41
1/2 Cystine	6,7	7,8	7,8	7,4	8
Valine	38,0	40,3	42,4	42,4	45
Méthionine	12,4	11,8	14,7	13,0	14
Isoleucine	17,5	19,7	19,3	19,5	21
Leucine	62,0	61,5	60,2	61,2	65
Tyrosine	22,1	21,2	23,1	22,1	24
Phénylalanine	32,3	30,3	29,9	30,8	33
Tryptophanne					22

L'enzyme placentaire possède sept groupements thiol, lorsqu'elle est étudiée en présence de SDS. Une partie des groupements thiol de l'enzyme pourrait être dissimulée à l'intérieur de la molécule et ne se montrer accessible qu'en présence de détergent (189).

II.3.2.2.2. Propriétés catalytiques

— Spécificité de l' α -1,4-glucosidase acide

Comme pour la plupart des hydrolases lysosomiales, la spécificité de l' α -1,4-glucosidase acide est faible ; l'activité enzymatique peut être mise en évidence par des réactions hydrolytiques simples ou par des réactions de transglucosylation.

. réaction d'hydrolyse

La maltase acide (EC.3.2.1.20) est une *exoglucosidase* capable d'hydrolyser de nombreux glucosides naturels ou synthétiques en libérant de l' α -D-glucose.

L'hydrolyse du *maltose* et celle du *glycogène* ont été les plus étudiées (8) (54) (101) (126) (183) (228).

L'enzyme peut dégrader les oligosaccharides de la série du maltose ; *maltotriose*, *maltotétraose*, *maltopentaose*, *maltohexaose* (JEFFREY (126) sur le foie de rat, PALMER (183) sur l'enzyme de muscle de lapin). PALMER, en étudiant l'action de la maltase acide du muscle de lapin sur les maltosaccharides, envisage un mécanisme de type réaction en chaîne avec hydrolyse de la liaison α -1,4- non réductrice ; ainsi, la vitesse de libération du glucose est directement liée à la vitesse d'hydrolyse des liaisons α -1,4.

Le *paranitrophényl- α -maltoside* et le *méthyl- β -maltoside* sont des substrats pour l'enzyme de muscle de lapin (183).

L'action de l' α -1,4-glucosidase n'est pas limitée à la liaison α -1,4. En 1964, TORRES et OLAVARRIA (228) rapportent une hydrolyse de la liaison α -1,2- (*Kojibiose*), α -1,3- (*nigérose*), α -1- ϕ - (*α -phénylglucoside*) par la maltase de foie de chien. La liaison α -1,6- (*isomaltose*) est également scindée, mais la vitesse de réaction est lente (228).

En 1969, BRUNI et coll. (31) rapportent l'hydrolyse des liaisons α -1,6- du *dextran* par l'enzyme de boeuf. L'action de l'enzyme de rat sur le dextran est étudiée par JACQUES et coll. (124). L'hydrolyse de ce composé est lente. Le degré de dégradation du dextran dépend beaucoup de la proportion des différents types de liaisons que renferme la molécule (liaisons α -1,6-en majorité, mais aussi liaisons α -1,3-et α -1,2- (194). JEFFREY et coll. (125) montrent que l'enzyme de foie

de rat possède aussi bien une activité α -1,6-qu'une activité α -1,4-glucosidasique, du fait que le degré de purification de l' α -1,4-glucosidase (substrats : maltose, glycogène) et de l' α -1,6-glucosidase (substrat : isomaltose) est le même à chaque étape de la purification. De plus, dans les tissus d'enfants souffrant de glycogénose de type II, les activités α -1,4-et α -1,6-glucosidasiques acides sont absentes simultanément. L' α -glucosidase acide de foie de rat peut réaliser la *conversion totale du glycogène en glucose* (125) ; cette dégradation met en jeu les trois activités hydrolytiques essentielles de l'enzyme : α -1,4-glucosidase, α -1,6-glucosidase et glucoamylase. La vitesse de dégradation du glycogène est rapide au début, puis elle se ralentit car le facteur limitant est le débranchement du polysaccharide par rupture de la liaison α -1,6.

Le *panose* est un substrat de la maltase de lapin (183). Le *6-bromo-2-naphtyl- α -D-glucopyranoside* est hydrolysé par l'enzyme purifiée de foie de boeuf (31) et le *paranitrophényl- α -D-glucopyranoside* par l'enzyme de foie humain (172). Le *4-méthylumbelliféryl- α -D-glucopyranoside* est un substrat très utilisé car il permet la détermination fluorimétrique de l'activité enzymatique (54) (205).

La maltase acide est incapable de rompre la liaison α -1,1-(tréhalose), les liaisons α -1,4-glucosidiques (cellobiose), α -1,4-galactosidiques (lactose) ou α -1,6-galactosidiques (mélitiose) des disaccharides dans lesquels il existe une unité glucose terminale.

. activité de transglucosylation

En 1954, la formation enzymatique de riboflaviny-glucoside par le transfert de glucose, à partir de maltose, sur la riboflavine est décrite par WHITBY (237) à propos du foie de rat. La réaction de transglucosylation a surtout été étudiée par TORRES et OLAVARRIA (228), HERS et van HOOF (104), JEFFREY et coll. (125), PALMER (183) et de BARSY et coll. (54).

L'enzyme de foie de chien incubée en présence de ^{14}C -maltose et de glycogène forme du glucose et des oligosaccharides (tri - tétra et pentasaccharides). La radioactivité est également incorporée dans le glycogène (228).

BRUNI et coll. (32) montrent que l'enzyme de foie de boeuf peut incorporer du ^{14}C -glucose dans le glycogène, mais la vitesse d'incorporation est dix

fois plus lente qu'en présence de maltose comme donneur de glucosyl. L'activité de transglucosylation semble bien spécifique de l'enzyme car elle augmente parallèlement à celle de l'hydrolyse au cours de la purification (125). L' α -glucosidase acide catalyse le transfert de résidus glucosyl pour former des liaisons α -1,4-et α -1,6,- mais il y a peu d'unités ^{14}C -glucose transférées du ^{14}C -maltose dans le glycogène en position α -1,6-. C'est la moitié glucosyl non réductrice du maltose qui est transférée dans l'oligosaccharide (184). Il n'a pas été mis en évidence de transfert de glucose en position α -1,2-et α -1,3-(184).

En dehors du glycogène, le maltose, le maltotriose, le maltotétraose (54) (126) (184) (228) peuvent servir d'accepteurs dans le transfert de glucosyl. Le tableau VI (page 40) rassemble les valeurs des Km de l'enzyme purifiée déterminées sur différents substrats.

— pH optimum d'activité

La détermination du pH optimum d'activité est un facteur essentiel pour l'identification de la maltase acide. Son pH optimum acide, caractéristique des enzymes lysosomiales, permet de la distinguer des maltases neutres microsomales qui sont capables, elles aussi, d'hydrolyser le maltose et le glycogène.

Sur le substrat maltose, le pH optimum de l'enzyme purifiée est compris entre 3,7 et 4,8 d'après les données de la littérature ; l'hydrolyse du glycogène est optimale à un pH un peu plus alcalin (4 à 5,2). KOSTER et SLEE (137) montrent que l'addition d'albumine à l'enzyme purifiée de foie humain entraîne un déplacement du pH optimum d'activité d'hydrolyse du glycogène de 5,0 à 4,5. L'enzyme est activée par l'addition d'albumine, cette activation étant plus prononcée à pH acide. L'influence des ions sur le pH optimum de l'activité hydrolytique sera envisagée plus loin.

Le pH optimum de l'activité transférasique est plus alcalin que celui de l'activité hydrolytique sur le maltose. Pour de BARSY et coll. (54) cette différence est de 0,5 à 1 unité pH pour les enzymes de foie de rat et de placenta humain.

— stabilité de l'enzyme

. stabilité de l'enzyme en fonction du pH

En 1969, BRUNI et coll. (31) rapportent l'influence du pH sur l'activité maltasique après préincubation de la protéine purifiée pendant une heure à 25°C

dans des tampons de pH 4 à 10. Jusqu'à un pH de 6,7, l'activité n'est pas affectée de manière significative ; à pH 9 une baisse de 50 % de l'activité est observée alors qu'à pH 10 l'inactivation de l'enzyme est complète.

PALMER (184), en étudiant l'enzyme de muscle de lapin, met en évidence deux zones de stabilité maximale de l'enzyme en fonction du pH : l'une à pH neutre, l'autre à l'optimum acide de pH. Les activités maltasique et glucoamylasique varient différemment en fonction du pH de préincubation, la stabilité maximale de l'activité maltasique étant située à pH 4,5 et celle de l'activité glucoamylasique à pH 6,9. Les propriétés immunologiques de l'enzyme sont altérées également par un traitement à pH 10 pendant une heure : il y a alors disparition de la ligne de précipitation en gélose lorsque l'enzyme traitée à pH 10 est mise à diffuser contre des anticorps spécifiques (54).

QUINTART (189) montre que l'addition d'albumine bovine (à la concentration de 1 mg/ml) à l'enzyme placentaire purifiée améliore considérablement sa conservation à pH acide, alors qu'elle est sans effet sur la stabilité de l'enzyme à pH alcalin.

. stabilité aux agents chimiques

La dialyse d'une solution enzymatique purifiée contre un tampon phosphate renfermant 2 % de dodécylsulfate de sodium entraîne une précipitation massive de l' α -1,4-glucosidase acide.

L'inactivation de la maltase acide par la guanidine 6 M est très rapide, elle est presque totale en quinze minutes. Cependant, l'inactivation de l'enzyme n'apparaît qu'à partir d'une molarité de 3 en guanidine (132). Rappelons qu'un traitement de l' α -glucosidase par un mélange guanidine - HCl 5 M permet sa dissociation en sous-unités.

BRUNI et coll. (31) ont testé l'effet de plusieurs réactifs des groupements thiols (acide iodacétique, iodacétamide, maléimide, para-chloromercuribenzoate) sur l'activité enzymatique. Ces réactifs n'altèrent pas l'activité enzymatique et protégeraient, au contraire, la maltase purifiée de foie de boeuf contre l'inactivation par les agents alcalins. Ces résultats sont infirmés par PALMER (184) à propos de l'enzyme de lapin ; cet auteur décrit une inactivation à pH 7 par l'iodoacétate presque complète sur le substrat glycogène alors que sur le substrat maltose l'activité résiduelle atteint 73 à 95 %. Des groupements thiols

pourraient donc être impliqués dans l'interaction de l' α -glucosidase avec le glycogène.

. stabilité à la température

La maltase acide présente une bonne thermostabilité. Pour FUJIMORI et coll. (82) , l'activité maltasique et l'activité glucoamylasique de l'enzyme de la rate de boeuf ne sont pas affectées de la même manière par l'élévation de température. Après incubation pendant quinze minutes à 60°C, l'activité maltasique est conservée à 90 % alors que l'activité glucoamylasique est diminuée de 60 % environ. A 70°C, les deux activités sont nulles. BRUNI et coll. (31) montrent que l'enzyme de foie de boeuf est stable jusqu'à 50°C et que les activités maltasiques et glucoamylasiques ont le même comportement. Les conclusions de PALMER (184) à propos de l' α -1,4-glucosidase de muscle de lapin sont les mêmes que celles de BRUNI.

L'enzyme placentaire est stable après préincubation trente minutes à 45°C à pH 4 et en présence d'albumine bovine. A 55°C, il subsiste encore 88 % de l'activité, l'inactivation complète est observée à 70°C (189). L'inactivation est rapide à un pH plus alcalin que 7 (52).

— Influence des ions

L'influence des ions sur l'hydrolyse du glycogène, d'une part, et sur l'hydrolyse du maltose, d'autre part, est différente.

JEFFREY et coll. (125) remarquent que le chlorure de potassium (KCl) améliore la conservation de l'enzyme purifiée de foie de rat. L'influence de ce sel sur l'activité enzymatique est donc envisagée par ces auteurs : une activation apparente de l'enzyme est observée en présence de KCl, *elle est plus importante sur le substrat glycogène que sur le substrat maltose*. Lorsque la concentration en KCl augmente de 4,5 à 115 mM à pH 4,2, la V_{max} de la réaction d'hydrolyse du glycogène augmente de 8,9 fois et la K_m passe de 0,7 à 6,5 mM. En outre, pour une forte concentration en glycogène l'activation de la réaction est progressive avec l'augmentation de la molarité en KCl alors que pour de faibles concentrations en glycogène, la vitesse de la réaction augmente d'abord puis décroît avec l'élévation de la concentration en K^+ .

Le fait le plus frappant dans cette activation par le KCl est le déplacement du pH optimum de la réaction d'hydrolyse du glycogène vers un pH plus acide lors de l'addition de KCl (déplacement de pH de 5,0 à 4,5 en présence de KCl 0,2 M). L'activation plus faible observée pour le maltose et l'isomaltose est indépendante du pH.

JEFFREY et coll. (125) pensent que l'effet stimulateur du KCl est dû aux ions K^+ plutôt qu'aux ions Cl^- car le chlorure de potassium, le bromure de potassium, l'iodure de potassium ou le sulfate de potassium en tampon acétate pH 4 produisent sensiblement la même activation pour une même concentration en potassium. L'activation de l'activité glucoamylasique de la maltase de foie de rat est également observée sous l'influence d'autres cations monovalents (potassium, sodium, lithium, ammonium) ou divalents (calcium et magnésium).

PALMER (183) arrive aux mêmes conclusions que JEFFREY et coll. en déterminant l'influence du chlorure de sodium sur l'activité de l'enzyme de lapin. Cet auteur signale cependant que le rôle de l'anion est certainement à considérer puisque le nitrite de sodium n'active pas l'enzyme. De plus, la stimulation par les ions Co^{2+} est rapportée. A l'inverse, BRUNI et coll. (31) notent une inactivation de l'enzyme par les ions Cu^{2+} et surtout Hg^{2+} .

En 1971, SICA et coll. (215) étudient la stimulation de l'activité maltasique de l'enzyme purifiée de foie de boeuf par le KCl. Ce sel diminue la K_m vis-à-vis du maltose, mais la V_{max} n'est pas modifiée.

En 1972, de BARSY et coll. (54) montrent également que les ions Na^+ et K^+ stimulent l'enzyme de foie de rat et l'enzyme placentaire.

PALMER (183) pense que les cations exercent leur activation en agissant sur la liaison C-O de manière à faciliter l'attaque nucléophile de l'enzyme en C_1 .

L'effet des ions sur l'hydrolyse du glycogène est donc très importante ainsi que la dépendance de la stimulation vis-à-vis du pH ; JEFFREY et coll. (125) ont d'ailleurs émis l'hypothèse que le catabolisme du glycogène intralysosomal *in vivo* pourrait être en partie régulé par les variations de pH ou la concentration en sel dans les lysosomes.

— Inhibiteurs

. Inhibition par le substrat

L'inhibition de l'activité hydrolytique de la maltase acide vis à vis du substrat maltose à de fortes concentrations en maltose a été décrite pour l'enzyme de foie de boeuf par BRUNI et coll. (31), pour l'enzyme de foie de rat par JEFFREY et coll. (126), et pour l'enzyme de muscle de lapin par PALMER (183).

L'enzyme humaine fait exception : de BARSY et coll. (54) sur l'enzyme placentaire et MURRAY et coll. (172) sur l'enzyme hépatique, ne trouvent pas d'inhibition par le maltose.

L'inhibition des enzymes animales par le substrat est observée également pour le maltotriose, le maltotétraose, le maltopentaose (126) et le paranitro-phényl- α -maltoside (183) ; l'inhibition apparaît quand la concentration en substrat dépasse 5 à 10 mM. La K_i pour le maltotriose, le maltotétraose et le p-nitro-phényl- α -maltoside est de 10 mM avec l'enzyme de lapin (183); sauf pour le maltotétraose, l'action importante de ces maltosaccharides comme inhibiteurs est parallèle à leur grande affinité comme substrats. PALMER (184) pense que l'inhibition par le maltose est due à la compétition du maltose avec l'eau pour le même site. Le remplacement de l'eau par le maltose à ce site donne lieu à une réaction de transglucosylation à la place d'une réaction hydrolytique. de BARSY et coll. (54) ne croient pas à cette hypothèse car l'enzyme humaine, qui ne présente pas d'inhibition par le substrat, forme des oligosaccharides de plus haut poids moléculaire à partir du maltose sensiblement à la même vitesse que l'enzyme de rat.

L'inhibition de l'activité glucoamylasique de la maltase à de fortes concentrations en glycogène n'est pas observée (54; 183). L'activité de l'enzyme vis-à-vis du glycogène augmente avec la longueur des chaînes externes (183). L'isomaltose ne montre pas d'inhibition par le substrat au moins jusqu'à une concentration de 76 mM ; cette propriété rapproche l'action de la maltase acide sur la liaison α -1,6- de l'isomaltose de son action sur les liaisons α -1,4- du glycogène.

L'inhibition mutuelle entre les différents substrats a été étudiée : JEFFREY et coll. (126) montrent pour l'enzyme de rat que le glycogène est un

inhibiteur compétitif de l'hydrolyse du maltose et inversement. Il en est de même avec l'enzyme de muscle de lapin. L'isomaltose est un inhibiteur compétitif de l'hydrolyse du maltose (126 ; 215).

L'hydrolyse du 4-méthylumbelliféryl- α -D-glucoside (MU-glucoside) par l'enzyme placentaire ou de rat est inhibée de manière compétitive par le maltose (54). Pour l'enzyme de foie humain, KOSTER et SLEE (137) mettent en évidence une inhibition non compétitive du maltose sur l'hydrolyse du MU-glucoside alors que l'inhibition du glycogène sur ce même substrat est compétitive.

• inhibition par le produit de réaction

Dès 1964, TORRES et OLAVARRIA (228) signalent que le *glucose* est un inhibiteur compétitif de l'hydrolyse de l' α -phénylglucoside ($K_i = 5,85$ mM). BRUNI et coll. (32), utilisant le 6-bromo-2-naphtyl- α -D-glucopyranoside comme substrat de l'enzyme de foie de boeuf, mesurent une inhibition de 50 % et 100 % à des concentrations en glucose respectivement de 10 et 100 mM. Cette inhibition est retrouvée par SICA et coll. (215) avec le maltose comme substrat.

Le glucose inhibe de manière compétitive l'hydrolyse du MU-glucoside par l'enzyme de foie de rat ou de placenta humain (54).

La réaction de transglucosylation à partir de ^{14}C -maltose est inhibée à des concentrations en glucose supérieures à 5 mM.

• autres inhibiteurs

L'inhibition par le turanose a été la plus étudiée ; elle permet classiquement de différencier la maltase acide qui est inhibée par le turanose de la maltase neutre qui n'est pas inhibée. En outre, nous envisageons l'inhibition par les oligosaccharides, les lactones, les polyols et le Tris.

Le D (+) *turanose* ou 3-O-(α -D-glucopyranosyl)-D-fructose n'est pas un substrat de la maltase acide, mais il inhibe son activité. LEJEUNE et coll. (150) trouvent que l'inhibition de l'enzyme de foie de rat par le turanose n'est pas compétitive.

AURICCHIO et BRUNI (7) confirment l'inhibition de l'hydrolyse du maltose par le turanose 30 mM à propos de l'enzyme de foie de rat et de rein humain ;

ils notent que cette inhibition s'exerce aussi sur l'hydrolyse du glycogène. L'inhibition de la maltase de foie de boeuf par le turanose est de type compétitif (31).

L' α -1,4-glucosidase de rate de boeuf est également inhibée par le turanose ; l'activité maltasique est plus diminuée que l'activité glucoamylasique (82).

Les résultats de JEFFREY et coll. (126) montrent que l'inhibition exercée par le turanose sur l'enzyme de foie de rat est de type mixte : avec le glycogène, elle est purement non compétitive, avec le maltose elle semble compétitive ($K_i = 2,8$ mM) et avec l'isomaltose, le type d'inhibition dépend de la concentration en turanose mais elle semble devenir purement non compétitive quand la concentration en turanose s'élève au-dessus de 5 mM.

PALMER (183) confirme les résultats précédents en étudiant l'enzyme de muscle de lapin : le turanose modifie surtout la V_{max} . lors de l'hydrolyse du glycogène, la K_m n'étant que légèrement augmentée, l'inhibition tend donc vers le type non compétitif ($K_i = 1,4$ mM).

L'inhibition par le turanose de l'activité de l'enzyme placentaire est de type compétitif quand le substrat est le MU-glucoside et de type non compétitif quand le substrat est le glycogène (54).

PALMER (184) a testé l'inhibition de l'enzyme de lapin par différents *oligosaccharides* renfermant un groupement glucosyl à l'extrémité réductrice.

La concentration en ions doit être considérée. Lorsque la concentration en Na^+ est de 200 mM, l' α -tréhalose, le méthyl- α -D-glucoside, le sucrose et le mélizitose sont des inhibiteurs compétitifs et sélectifs de l'enzyme sur le substrat glycogène. L'action sur le maltose n'est pas inhibée dans ces conditions. Si la concentration en Na^+ n'est que de 2 à 25 mM, l'inhibition n'est pas aussi sélective et l'activité maltasique est inhibée en partie. L'enzyme de boeuf est également inhibée par l' α -méthyl-glucoside et le tréhalose de manière compétitive, à la fois pour l'hydrolyse du maltose et pour celle du glycogène (215).

Les *monosaccharides* D-allose, D-mannose, D-xylose et D-fructose sont inhibiteurs à concentration 25 mM sur les deux activités glucoamylasique et maltasique. En revanche, le D-arabinose et le D-galactose ne sont pas inhibiteurs : *le groupement hydroxyle en position équatoriale sur le carbone 4 est donc indispensable à la fixation des monosaccharides sur le (ou les) site(s) inhibiteur(s).*

L'inhibition par la *glucono-1,5-lactone* est compétitive pour le glycogène ($K_i = 1,2$ mM) et pour le maltose ($K_i = 0,6$ mM). Comme pour l'inhibition par le turanose, l'inhibition par la δ -glucono-lactone de l'activité maltasique de l'enzyme de lapin sur le maltose est diminuée à des concentrations en maltose supérieures à 5 mM. L'acide D-glucuronique et sa lactone sont également des inhibiteurs compétitifs puissants de l'enzyme. L'acide D-gluconique et la γ -lactone de l'acide D-allonique sont faiblement inhibiteurs.

L'inhibition des glucosidases par les *polyols* est bien décrite par KELEMEN et WHELAN (132). L'*érythritol* est l'inhibiteur le plus puissant de l'activité enzymatique de l'orge germé (132) (substrat : p-nitrophényl- α -D-glucoside) ; l'inhibition est de type compétitif. PALMER (184) trouve une inhibition non compétitive de l'*érythritol* sur l'enzyme de lapin en étudiant l'hydrolyse du glycogène et du maltose. AURICCHIO et coll. (8), BRUNI et coll. (31) décrivent une inhibition compétitive de l'*érythritol* sur l'activité hydrolytique du maltose par l'enzyme de rein humain ou de foie de rat et de boeuf.

L'inhibition par le *glycérol* est complexe. Avec le maltose, l'inhibition est non compétitive, avec le glycogène la nature de l'inhibition dépend de la concentration en glycérol.

Le *Tris* est un inhibiteur compétitif pour BRUNI et coll. (31) et PALMER (183) ($K_i = 7$ mM pour l'enzyme de lapin sur le glycogène ou le maltose).

Il faut encore signaler que l'inhibition par le Tris, l'*érythritol* et le glycérol est fortement diminuée pour des concentrations en maltose supérieures à 5 mM.

Les principales propriétés catalytiques de la maltase acide animale et humaine sont résumées dans le tableau VI. Les résultats de l'étude des inhibiteurs, de l'effet des cations et du pH sur l'hydrolyse comparée du maltose et du glycogène par l' α -glucosidase acide purifiée permettent d'aborder la question des sites catalytiques de l'enzyme.

AUTEURS	LEJEUNE ET COLL.	TORRES ET OLAVARRIA	AURICCHIO ET BRUNI		FUJIMORI ET COLL.	AURICCHIO ET COLL.	
ANNEE	1963	1964	1967		1968	1968	
SOURCE	Foie de rat	Foie de chien	Foie de rat	Rein humain	Rate de boeuf	Foie de rat	Rein humain
<u>pH optimum :</u>							
.Maltose	4	4,8	4,5	4,5	4,3		
.Glycogène		5,2	5	4,7	4,6		
.MU-glucoside							
.6-bromo-2-naphtyl- α-D-glucoside							
.paranitrophényl α-D-glucoside							
.Isomaltose							
.Dextran							
.Transglucosylation							
<u>Km :</u>							
.Maltose		4-5 mM				4,7 mM	13,6 mM
.Glycogène		16 mM					
.Nigérose		6,6 mM					
.α-phényl-glucoside		10 mM					
.6-bromo-2-naphtyl- α-D-Glucoside							
.Isomaltose							
. Panose							
.Maltotriose							
.Paranitrophényl α-maltoside							
.MU-glucoside							
<u>Inhibiteurs :</u>							
. Glucose M.	+						
10 mM MU							
. Turanose 5 mM M.	50 %				30 %		
G.					10 %		
10 mM MU							
28 mM M.					70 %		
G.					20 %		
30 mM M.	100 %		90 %	95 %			
G.			90 %				
. Tris 0,38 M M.						97 %	97 %
G.						95 %	98 %
. Erythritol M.						81 %	83 %
G.						90 %	90 %
. Hg ⁺⁺ 10 ⁻⁴ M							
. Cu ⁺⁺ 10 ⁻² M							
. Cu ⁺⁺ 10 ⁻³ M							
. Maltose M.							
MU							
. Glycogène MU							
. Glycérol M.							
G.							

DE L'ALPHA-1,4-GLUCOSIDASE PURIFIEE

BRUNI ET COLL.	JEFFREY ET COLL.	BRUNI ET COLL.	PALMER	SICA ET COLL.	DE BARSY ET COLL.		KOSTER ET SLEE	MURRAY ET COLL.
1969	1970	1970	1971	1971	1972		1977	1978
Foie de boeuf	Foie de rat	Foie de boeuf	Muscle de lapin	Foie de boeuf	placenta humain	Foie de rat	Foie Humain	Foie Humain
4,5 4,5 4,5 4,5 4,5	3,7 4,4 4,2 4 5		4,5 5,1		4,0 4,0	4,5 4,0	4,2 5	4 4,6 4,7 4,4 4,2
10^{-2} M 28 mg/ml 4 mM	3,8 mM 32,9 mM		3,7 mM 20 mM 1,8 mM 1,2 mM	10 mM 32 mg/ml 140 mM	11 mM 2 % 1,1 mM	7,3 mM 1,3 % 0,7 mM	10 mM 50 mg/ml	8,9 mM 9,62 mM 33 mM
ki : 1,4 mM ki : 5 mM ki: 27 mM 100 % 60 % 30 %	ki: 2,8 mM ki : 62mM		ki: 7 mM ki: 7 mM ki:133mM ki:125mM ki:370mM ki:260mM	ki : 4,3mM	ki:11,5 ki: 3 mM	ki :7,3 ki:1 mM		- ki:15,8 ki:6mM 25 mM 45mg/ml

G : SUBSTRAT GLYCOGENE

MU : SUBSTRAT MU-GLUCOSIDE

— sites catalytiques

Bien que l'hydrolyse du glycogène et celle du maltose soient dues initialement toutes les deux à la rupture de la liaison α -1,4-glucosidique, différents arguments plaident en faveur de l'hypothèse que ces deux substrats ne se fixent pas sur le même site catalytique de l'enzyme :

- les courbes d'activité de l'enzyme en fonction du pH sont différentes pour le maltose et le glycogène,
- l'hydrolyse des deux substrats est influencée différemment par la concentration en cations,
- l'influence des inhibiteurs sur l'activité maltasique d'une part et sur l'activité glucoamylasique d'autre part est souvent distincte.

Selon JEFFREY et coll. (126), il y aurait *deux sites catalytiques* distincts pour le maltose et pour le glycogène ; cependant, ces sites seraient assez proches l'un de l'autre pour que la fixation d'un substrat sur un site puisse influencer la fixation de l'autre substrat sur le second site dans le cas où le maltose et le glycogène sont présents simultanément dans le milieu réactionnel.

Le site de fixation du maltose pourrait également recevoir des oligosaccharides de faible poids moléculaire. Ce même site semble posséder quelque affinité pour les disaccharides possédant la liaison α -1,6- puisque l'isomaltose est un inhibiteur compétitif de l'hydrolyse du maltose. L'autre site catalytique fixerait donc les polysaccharides comme le glycogène.

En plus des deux sites de fixation, JEFFREY et coll. (126) pensent qu'il existe un *site inhibiteur* sur l'enzyme auquel peuvent se lier le maltose et d'autres oligosaccharides de faible poids moléculaire possédant des liaisons α -1,4- . Les polysaccharides et les disaccharides possédant les liaisons α -1,6- (isomaltose) auraient peu d'affinité pour ce site. Le D-turanose aurait de l'affinité pour ce site inhibiteur et également peut-être pour le site catalytique des oligosaccharides. Le turanose se comportant presque comme un inhibiteur purement non compétitif de l'hydrolyse du glycogène, son affinité pour le site de fixation du glycogène est nulle ou très faible.

PALMER (184) admet l'hypothèse de JEFFREY et coll. La différence de stabilité en fonction du pH des activités maltasiques et glucoamylasiques suggère que l'interaction de l'enzyme avec les deux substrats met en jeu des sites sur l'enzyme possédant des groupements dont la stabilité en fonction du pH est très différente. Ces groupements pourraient être impliqués dans le site catalytique ou le site de liaison ou il pourrait posséder un rôle conformationnel important. L'action de l'enzyme de lapin sur le glycogène est supprimée de manière sélective à pH 7 par l'iodoacétate ou l'iodacétamide : il y aurait alkylation d'un groupement thiol ou d'un amino-acide (méthionine, histidine, tyrosine) qui empêcherait l'approche du glycogène, mais non celle du maltose. PALMER (184) n'écarte pas la possibilité de l'existence d'un seul site actif qui serait composé de "sous-sites" comme pour le lysozyme. Dans ces conditions, il pourrait se produire des mutations sur les "sous-sites". Dans certaines formes atypiques de glycogénose type II, HERS et VAN HOOFF (104) ont décrit une diminution très importante de l'activité de transglucosylation alors que l'activité hydrolytique sur le maltose est assez bien conservée (environ 50 %). Ceci peut s'expliquer par une mutation spécifique du "sous-site" de transglucosylation.

KOSTER et SLEE (137) estiment que, pour le fonctionnement optimal de l' α -glucosidase acide purifiée de foie humain, un environnement protéique est nécessaire. La présence de protéine influencerait le site actif.

II.3.2.2.3. Propriétés immunologiques

Du fait de son haut poids moléculaire, la maltase acide purifiée constitue un bon antigène. Des anticorps dirigés contre l'enzyme du placenta humain (54), contre l'enzyme de foie humain (142,172) et contre l'enzyme de foie de rat et de souris (54) ont été obtenus après immunisation du lapin. Les gamma-globulines sont isolées du sérum de l'animal par précipitation au sulfate d'ammonium et purifiées par chromatographie sur DEAE-Séphadex A-50 (52).

de BARSY et coll. (54) montrent que l'hydrolyse du glycogène et la transglucosylation sur le glycogène à partir du maltose par l'enzyme de foie de rat ou de placenta humain sont inhibées à 90 ou 100 % par les anticorps spécifiques. KOSTER et coll. (142) et MURRAY et coll. (172) confirment ces résultats en étudiant l'enzyme de foie humain. L'inhibition de ces réactions porte surtout sur la V_{max} . et très peu sur la K_m (54). de BARSY et coll. (54) pensent donc avec CINADER (42) que certaines molécules d'enzyme se lient intimement avec les

anticorps spécifiques et perdent totalement leur activité hydrolytique sur le glycogène alors que d'autres molécules restées entièrement libres gardent toute leur activité.

L'hydrolyse des substrats de faible poids moléculaire (maltose ou MU-glucoside) n'est que partiellement inhibée par les anticorps spécifiques. Cette différence d'inhibition entre l'hydrolyse de substrats de haut et de faible poids moléculaire pourrait s'expliquer par un encombrement stérique : dans les complexes enzyme - anticorps, l'accessibilité du centre actif ne serait possible que pour les molécules de petite taille (maltose, MU-glucoside) (54). L'hydrolyse de l'isomaltose est aussi inhibée par les anticorps (172), l'inhibition de la réaction étant intermédiaire entre celle observée pour le glycogène et celle observée pour le maltose.

L'enzyme de souris est moins inhibée par les anticorps spécifiques que ne l'est l'enzyme de rat ; la distance entre les sites actifs et antigéniques serait donc plus grande pour la maltase acide de souris que pour la maltase acide de rat (54).

KOSTER et coll. (142) rapportent que les anticorps dirigés contre l'enzyme de foie humain sont également capables d'inhiber l'activité de l'enzyme de coeur et de muscle humain. de BARSY et coll. (54) précisent que, pour une même espèce, la quantité d'enzyme inhibée par une quantité donnée d'anticorps est la même quel ~~que~~ soit le tissu examiné. L'antigénicité croisée entre les espèces différentes est variable et dépend de l'origine de l'enzyme examinée et de l'échantillon d'anticorps utilisé.

Les anticorps antimaltase acide sont des *anticorps précipitant* lorsqu'ils sont testés contre l'enzyme selon la technique de double diffusion en gélose d'OUCHTERLONY.

Le marquage des gamma-globulines à l'isothiocyanate de fluorescéine ou le traitement par la neuraminidase n'altèrent pas leur pouvoir inhibiteur (54).

Les anticorps spécifiques antimaltase acide n'inhibent pas la maltase neutre (54).

L'utilisation d'anticorps spécifiques anti-maltase acide pourrait permettre la mise en évidence, dans les tissus des malades atteints de glycogénose de type II, d'une protéine (si elle existe) qui conserverait les caractères immunologiques de la maltase acide malgré la perte des propriétés catalytiques.

Les caractéristiques que nous venons de préciser pour l'enzyme purifiée à partir d'un tissu donné ne peuvent être transposées, dans leur intégralité, aux homogénats tissulaires correspondants. En effet, dans les homogénats, les interférences peuvent être nombreuses : la présence de glycogène endogène ou d'oligosaccharides libérés sous l'action de l' α -amylase peut fausser les résultats des réactions utilisant le glycogène, le maltose ou l'isomaltose comme substrats, la présence de maltase neutre qui possède une activité résiduelle à pH 4,0 non négligeable peut rendre difficile l'interprétation d'un dosage de maltase acide à pH 4, l'influence des ions présents dans les homogénats peut contrarier l'étude de la stimulation de l'activité enzymatique par les sels.

II.4. PHYSIOLOGIE DE L' α -1,4-GLUCOSIDASE ACIDE HUMAINE

Avant d'envisager le rôle physiologique de l' α -1,4-glucosidase acide, nous définirons les caractéristiques de l'enzyme dans les différents tissus des sujets normaux. Nous insisterons plus particulièrement sur ses propriétés électrophorétiques.

II.4.1. L' α -1,4-glucosidase acide des différents tissus et milieux biologiques humains :

II.4.1.1. Le Foie

Les propriétés de l'enzyme hépatique humaine purifiée ont été décrites précédemment.

Les caractéristiques de la maltase acide dans les homogénats hépatiques sont très voisines de celles de l'enzyme purifiée : citons en particulier, le pH

optimum d'activité égal à 4 (substrat : maltose et MU-glucoside) (204), et la thermostabilité (activité inchangée après incubation d'un homogénat hépatique pendant 5 minutes à 50°C à pH 4) (142). Selon l'hypothèse de KOSTER et SLEE (137), l'environnement protéique que rencontre la maltase acide hépatique dans les homogénats doit permettre à celle-ci de fonctionner dans des conditions optimales.

Les électrophorèses d'homogénats hépatiques en gel de polyacrylamide (204), ou sur acétate de cellulose (67) (68) ne montrent qu'une seule bande fluorescente après révélation à pH 4 par le MU-glucoside. La révélation à pH 6,5 visualise deux bandes, la bande la plus lente étant située exactement au même niveau que la bande d'activité maltasique acide révélée à pH 4.

La focalisation électrique met en évidence la présence de trois bandes fluorescentes après migration dans un gel de polyacrylamide renfermant des ampholines (pH 4 à 6) et après révélation à pH 4 par le MU-glucoside.

II.4.1.2. Le muscle

L'activité spécifique de l' α -1,4-glucosidase dans le muscle est faible, elle est environ dix fois moins élevée que dans le tissu hépatique.

La courbe de pH de la réaction d'hydrolyse du maltose montre deux pics d'activité : le pic principal est situé à pH 4,5 et l'autre pic à pH 6,5 (1) ; ils correspondent respectivement à la présence d'une maltase acide (qui peut être inhibée de manière compétitive par le turanose) (138) et d'une maltase neutre. Ces deux enzymes peuvent être séparées par électrophorèse sur acétate de cellulose (67). L'activité maltasique acide révélée à pH 4 est localisée au niveau d'une seule bande de migration ; DREYFUS et ALEXANDRE (67) remarquent que cette bande à pH 4 n'est pas identique à la bande lente que l'on révèle à pH 6,5, mais elle est un peu plus anodique. MEHLER et DI MAURO (168) obtiennent trois bandes à pH 6,5 après électrophorèse sur acétate de cellulose également.

Par focalisation électrique, trois bandes sont détectées comme pour le foie (142).

II.4.1.3. Le coeur

Le pH optimum d'activité de l'enzyme du coeur sur le substrat maltose est de 5 (1) et 4,5 sur le substrat MU-glucoside (62). L'activité maltasique

à pH 6,5 est très faible (62).

Les propriétés de l'enzyme cardiaque sont voisines de celles de l'enzyme de foie : le comportement est le même à l'électrophorèse sur acétate de cellulose (168) ; trois bandes sont obtenues après focalisation électrique (142), la thermostabilité est identique (142).

II.4.1.4. Le cerveau

Le cerveau (matière grise) possède très peu d'activité maltasique acide (pH optimum 4,5), il renferme surtout de la maltase neutre (62).

Par électrophorèse sur acétate de cellulose, MEHLER et DI MAURO (168) obtiennent une bande à pH 4 et deux bandes à pH 6,5.

II.4.1.5. Le rein

L' α -1,4-glucosidase du rein possède des propriétés très particulières. En 1967, STEINITZ et RUTENBERG (220) montrent que la maltase du rein ne présente pas un pH optimum d'activité bien défini ; il se situe entre pH 3,5 et 9,5, que l'activité soit mesurée sur le maltose ou sur le glycogène. L'activité enzymatique à pH 4 d'un homogénat de rein augmente peu, après traitement par une solution de mannitol hypotonique (220), ce qui n'est pas en faveur de la nature lysosomiale de la maltase rénale. De plus, l'inhibition par le turanose n'est que de 48 % à pH 4 (pour un homogénat de foie l'inhibition est de 92 %), cette inhibition étant comparable à celle qui est observée à pH 7 (220). STEINITZ. et RUTENBERG (220) en concluent que l'activité de l' α -glucosidase du rein mesurée à pH 4 n'est qu'en partie d'origine lysosomiale.

SALAFSKY et NADLER (202) confirment les résultats précédents ; avec le substrat maltose, ils notent un pH optimum de 6 pour l'enzyme rénale.

KOSTER et coll. (142) observent une thermostabilité de la maltase rénale différente de celle des autres tissus et en particulier, une stabilité à l'élévation de température qui varie suivant le substrat utilisé (maltose ou glycogène).

Par électrophorèse sur acétate de cellulose, DREYFUS et coll. (67) (68) mettent en évidence une *isoenzyme rénale* (présente après révélation à la fois à pH 4 et 6,5) qui a une migration très lente ou qui ne migre pas du tout.

La présence de cette isoenzyme pourrait expliquer certaines propriétés de l'enzyme du rein comme son comportement vis-à-vis de l'inhibition par le turanose (67).

II.4.1.6. Les leucocytes

La méthode utilisée pour isoler les leucocytes conditionne l'interprétation des résultats de l'étude enzymatique. Les différentes techniques de séparation des leucocytes conduisent à l'isolement de populations constituées d'un mélange en proportion variable de polynucléaires, lymphocytes et même de plaquettes. Par la méthode au dextran une population leucocytaire "normale" (polynucléaires et lymphocytes) est isolée alors que par la technique du film (procédé "Buffy Coat") des cellules mononuclées et des plaquettes sont préférentiellement séparées (139).

Le pH optimum de l'activité maltasique acide des leucocytes est voisin de 4 avec le substrat maltose (202) et de 4,5 pour le substrat glycogène (139). L'activité enzymatique mesurée à pH 4 est bien plus élevée dans les polynucléaires que dans les lymphocytes (139) (238) ; dans ces deux populations cellulaires, l'activité testée à pH 4 sur le maltose est partiellement inhibée par des anticorps antimaltase acide de foie humain ; si l'activité est étudiée sur le substrat glycogène une inhibition complète par les anticorps peut être obtenue avec l'enzyme lymphocytaire alors que l'enzyme des polynucléaires présente encore 20 % d'activité résiduelle après addition des anticorps. Les anticorps antimaltase acide placentaire inhibent également l'enzyme des leucocytes (52).

Le turanose peut inhiber complètement l'activité maltasique à pH 4 d'une préparation de leucocytes renfermant des polynucléaires et des lymphocytes (238). Cette inhibition n'est pas compétitive (138).

Les résultats de l'électrophorèse sur acétate de cellulose de l'enzyme leucocytaire seraient superposables à ceux obtenus avec l'enzyme de foie (67) (68).

II.4.1.7. Les fibroblastes cutanés

L'étude de l'enzyme dans les fibroblastes cutanés présente de nombreux avantages : les fibroblastes ne sont pas "limités" en quantité comme un prélèvement musculaire, ils peuvent constituer un modèle pour l'étude de l'enzyme ou pour des essais thérapeutiques, les cellules peuvent être stockées dans une banque pendant un temps presque illimité. Cependant, l'interprétation des résultats doit

toujours se faire par rapport à un témoin au même stade de culture et traité dans les mêmes conditions (43).

Comme pour certaines hydrolases lysosomiales, l'activité de l' α -glucosidase acide augmente au cours de la croissance des fibroblastes en culture (52) (85). De nombreux facteurs semblent intervenir dans l'explication de ce phénomène: la composition du milieu, la fréquence de son renouvellement et l'état de la culture (phase de croissance ou de confluence) (199). En fait, la synthèse de l' α -glucosidase acide se déroulerait au même rythme pendant toute la culture ; pendant la phase de croissance exponentielle des cellules, l'augmentation de l'activité spécifique se ferait donc lentement puis, s'accélérerait rapidement quand les cellules sont arrivées à confluence.

L'activité spécifique de l' α -glucosidase acide des fibroblastes est comparable à celle de l'enzyme hépatique, et ses propriétés enzymatiques et immunologiques semblables à celles de l'enzyme purifiée du placenta humain (52). Le pH optimum d'activité est de 4 sur le substrat maltose (202), les affinités pour le glycogène et le maltose sont comparables (52). L'inhibition de l'activité enzymatique est observée en présence de turanose, de tréhalose ou d'anticorps antimaltase placentaire. DREYFUS et coll. (68) mettent en évidence une dénaturation thermique de l'enzyme de fibroblastes après incubation à 55°C en tampon phosphate 20mM, pH 6,5. 50 % de l'activité mesurée à pH 4 est perdue ; de BARSY (52) montre à l'aide d'anticorps spécifiques que l'inactivation thermique porte bien sur la maltase acide.

KOSTER et coll. (140) ont réalisé l'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH 6,5 de l'enzyme de fibroblastes. Après révélation à pH 4, une seule bande est visible. A pH 6,5, trois bandes sont présentes, deux bandes adjacentes et une bande supplémentaire au point de départ.

II.4.1.8. Le liquide amniotique et les cellules amniotiques en culture

Pour SALAFSKY et NADLER (202), les propriétés de l' α -glucosidase du liquide amniotique se rapprochent de celles de l'enzyme rénale : pH optimum voisin de 6 (substrat : maltose) et inhibition modérée par le turanose à pH 4. Cependant, à la différence de la maltase du rein, la maltase du liquide amniotique est inactivée à plus de 90 % après exposition pendant 15 minutes à 45°C. SALAFSKY et NADLER (202) trouvent que l'activité α -1,4-glucosidasique du liquide amniotique

est sédimentable à des vitesses qui sont utilisées pour séparer les lysosomes ; mais, les auteurs n'excluent pas la possibilité de rupture de certaines cellules avec libération d'organelles intracellulaires.

FLUHARTY et coll. (80) rapportent un pH optimum de 5,8 pour l'hydrolyse du paranitrophényl- α -D-glucopyranoside par l'enzyme du liquide amniotique et montrent que cette activité n'est pas stimulée par le chlorure de potassium 0,1 M, contrairement à l' α -glucosidase lysosomiale de rat (80). FLUHARTY et coll. (80) confirment les résultats de l'inhibition par le turanose et la thermolabilité de l'enzyme du liquide amniotique signalés par SALAFSKY et NADLER (202) (ils trouvent une inactivation complète après préincubation à 55°C et à pH 5). Les auteurs pensent donc que l'activité mesurée à pH 5,8 n'est pas de nature lysosomiale et que sa détermination n'a aucun intérêt dans le diagnostic prénatal de la maladie de POMPE.

Cependant, l' α -glucosidase qui disparaît curieusement du liquide amniotique en fin de grossesse pourrait constituer un marqueur du développement foetal en indiquant que le foie foetal assume complètement la régulation du métabolisme du glucose à partir du moment où l' α -glucosidase n'est plus retrouvée dans le liquide amniotique.

Les *cultures de cellules amniotiques* se sont donc avérées indispensables pour établir de manière fiable le diagnostic prénatal de la maladie de POMPE. Des microtechniques de dosage de l'activité enzymatique se sont développées parallèlement (84).

Les propriétés de l' α -glucosidase acide des cellules amniotiques en culture (cellules fibroblastiques et épithélioïdes) sont très proches de celles de l'enzyme des fibroblastes cutanés. Le comportement électrophorétique est le même (140).

II.4.1.9. Les urines

En 1967, FRANZINI et BONINI (81) séparent deux α -glucosidases de l'urine humaine par chromatographie sur Séphadex G-200, puis sur DEAE-Séphadex. Les deux enzymes hydrolysent le maltose et le glycogène.

Deux ans plus tard, BONINI et coll. (22) attribuent une origine rénale à la maltase urinaire ; ils considèrent qu'une augmentation pathologique de l'élimination urinaire de l'enzyme peut constituer un index spécifique d'une atteinte

tubulaire rénale primaire ou secondaire.

SALAFSKY et NADLER (205) montrent que l'enzyme des urines de l'adulte présentent deux pH optima d'activité avec le substrat MU-glucoside, l'un à pH 4 et l'autre moins marqué à pH 5,5. Dans les urines de l'enfant, l'optimum de pH est plus large et compris entre 4,5 et 5,0. Chez l'adulte et l'enfant, l' α -glucosidase est inhibée de 77 à 98 % par la turanose 30 mM. L'enzyme urinaire est relativement stable (deux semaines à la température du laboratoire) (205).

SALAFSKY et NADLER (205) montrent que l'activité enzymatique urinaire est en fait, la résultante d'au moins deux activités enzymatiques : l'une présente les caractères de la maltase acide typique et l'autre ceux de l'enzyme rénale.

SOYAMA et coll. (218) isolent deux α -glucosidases urinaires après gel-filtration sur Séphadex G-100. Le premier pic élué I est constitué par l' α -glucosidase neutre et le pic II renferme l' α -glucosidase acide (pH optimum = 4 sur MU-glucoside). L'activité enzymatique du pic II (maltase acide) est stimulée par le chlorure de potassium à la fois à pH 4,0 et à pH 6,5 alors que ce sel inhibe l'activité de l'enzyme du pic I surtout à pH 4.

L'électrophorèse sur acétate de cellulose du pic II concentré par ultrafiltration montre une seule bande fluorescente (située au même niveau) après révélation à pH 6,5 ou à pH 4 à l'aide de MU-glucoside (219).

II.4.2. Rôle physiologique de l' α -1,4-glucosidase acide

Grâce aux travaux de DUVE et coll. (59), de HERS (101) et de LEJEUNE et coll. (150), le rôle de l' α -1,4-glucosidase dans la dégradation hydrolytique intralysosomiale du glycogène est maintenant bien établi.

II.4.2.1. La molécule de glycogène (45) (83) (151)

Le glycogène, isolé en 1857 par Claude BERNARD, est un polysaccharide de haut poids moléculaire (1 à plusieurs millions) formé par l'assemblage de très nombreuses unités glucosyl.

Cette macromolécule constitue la réserve glucidique animale et elle occupe la même place que l'amidon dans le règne végétal. On trouve environ 300 g de glycogène dans l'organisme dont plus de la moitié dans le foie. Les muscles

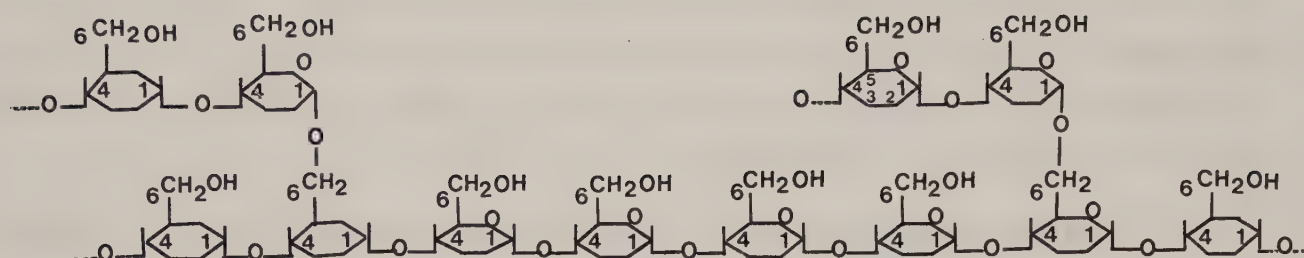


Fig. 3. L'enchaînement des molécules de glucose et leur mode de ramification dans la molécule de glycogène.

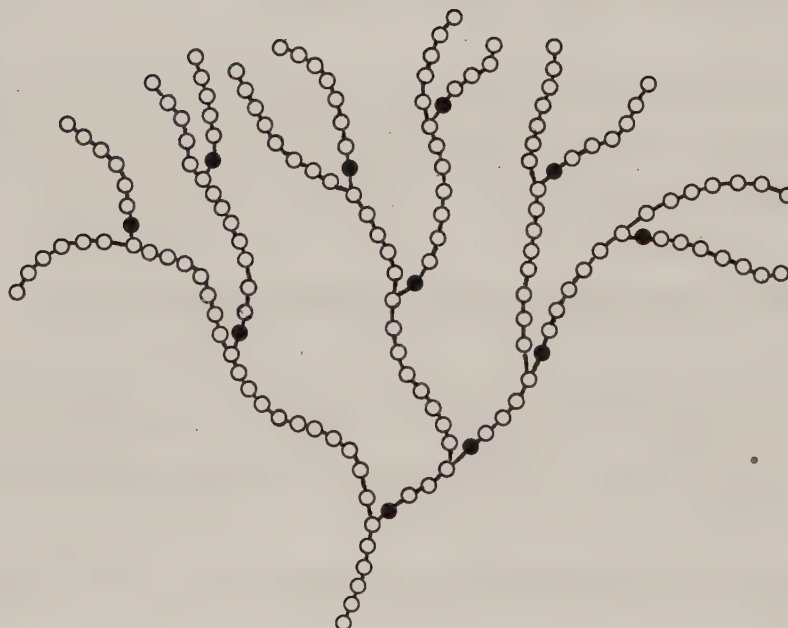


Fig. 4. La molécule de glycogène selon le modèle de G. CORI.

striés et le coeur en renferment également beaucoup.

Dans le glycogène, les liaisons entre les molécules d' α -D-glucose se font en position 1,4 ; lorsqu'une chaîne linéaire est constituée de 4 à 10 radicaux glucosyl, il se fixe une nouvelle chaîne en position α -1,6- (fig. n° 3). Celle-ci reçoit à son tour de nouveaux branchements latéraux ce qui aboutit finalement à une structure arborescente selon le schéma classique de CORI (fig. n° 4). Les chaînes externes renferment 7 à 13 molécules de glucose, elles sont plus courtes en période de jeûne.

Les molécules de glycogène peuvent être visualisées au microscope électronique ; elles sont généralement présentes dans le cytoplasme, mais aussi, comme nous le verrons, dans les lysosomes dans certaines conditions pathologiques.

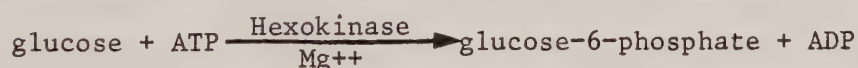
II.4.2.2. Le métabolisme du glycogène (45) (83) (151)

II.4.2.2.1. La synthèse

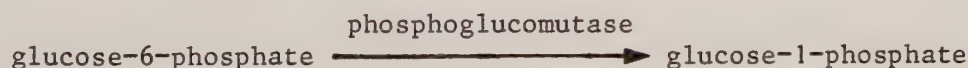
Les polysides alimentaires hydrolysés dans le tube digestif et la muqueuse intestinale sont apportés au foie par la circulation sanguine à l'état d'oses simples : glucose, fructose et galactose. Ces deux derniers sucres, après avoir été transformés en glucose, peuvent participer à la glycogénogénèse qui ne s'effectue qu'à partir du glucose. La formation du glucose peut être également réalisée par gluconéogénèse.

Schématiquement, la synthèse du glycogène se déroule en trois étapes :

1ère étape : *phosphorylation* du glucose en glucose-6-phosphate :

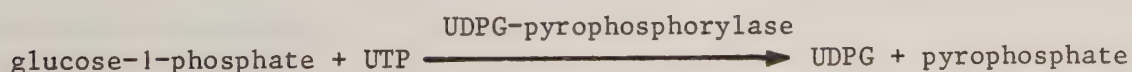


2ème étape : *isomérisation* du glucose-6-phosphate en glucose-1-phosphate :



3ème étape : *incorporation* du glucose-1-phosphate au glycogène.

Cette étape est plus complexe :



L'UDPG est ensuite fixé sur le glycogène sous forme de liaisons α -1,4- grâce à la *glycogène synthétase*.

Quand la longueur des chaînes externes devient trop grande (plus de dix résidus glucosylés), une liaison α -1,6- est formée grâce à l'*amylase-1,4-1,6-trans-glucosidase* ou *enzyme branchant*.

II.4.2.2.2. Le catabolisme

Le glycogène, mis en réserve selon les processus précédents, est dégradé au fur et à mesure des besoins de l'organisme de manière à assurer la constance de la glycémie.

Deux voies sont possibles pour la *glycogénolyse* :

. La voie phosphorolytique :

C'est la voie la plus anciennement connue. De même que pour la biosynthèse, trois étapes sont nécessaires :

1ère étape : formation du glucose-1-phosphate :

La *phosphorylase* attaque les branches externes du glycogène liées suivant le mode α -1,4- pour libérer des molécules de glucose-1-phosphate. L'action de la phosphorylase s'arrête lorsque 30 à 40 % du polysaccharide ont été transformés en glucose-1-phosphate. Le glycogène restant a la structure d'une "dextrine limitée" dont les branches externes sont très courtes. La poursuite de la dégradation de la molécule nécessite l'intervention de l'*amylase-1,6-glucosidase* ou *enzyme débranchant* qui réalise l'hydrolyse des liaisons α -1,6-. L'action de la phosphorylase peut donc à nouveau s'exercer. Par l'action successive de ces deux enzymes, le glycogène peut être complètement dégradé avec formation de 93 % de glucose-1-phosphate et de 7 % de glucose.

2ème étape : *isomérisation* du glucose-1-phosphate en glucose-6-phosphate sous l'action de la *phosphoglucomutase*.

3ème étape : *hydrolyse* du glucose-6-phosphate en glucose libre. Cette réaction se déroule sous l'action de la *glucose-6-phosphatase*. Le glucose-6-phosphate peut également être oxydé dans la voie des pentoses ou être dégradé en acide pyruvique dans la glycolyse.

• La voie hydrolytique et le rôle physiologique de l' α -1,4-glucosidase acide :

Cette voie de dégradation du glycogène est de découverte beaucoup plus récente (101) (150). Elle se déroule à l'intérieur des lysosomes sous l'action de l' α -1,4-glucosidase acide. A pH acide, cette exoglucosidase est capable de dégrader complètement la molécule de glycogène en glucose libre. La maltase acide peut donc, comme nous l'avons montré précédemment, réaliser l'hydrolyse des liaisons α -1,4- et des liaisons α -1,6- de la molécule ; cette dernière hydrolyse est l'étape limitante de la dégradation du glycogène par l'enzyme.

La maltase acide est également capable d'attaquer les oligosaccharides formés à partir du glycogène sous l'action de l' α -amylase.

L'importance physiologique de la réaction de *transglucosylation* que catalyse également l' α -1,4-glucosidase est mal connue. La K_m de la réaction de transfert à partir du maltose est semblable à celle de la réaction d'hydrolyse du maltose.

Le rôle respectif des deux voies de dégradation du glycogène dans les tissus normaux reste encore à définir. Néanmoins, il est permis de penser que la phosphorolyse est impliquée dans la dégradation rapide du glycogène qui se produit quand du glucose ou des glucose-phosphates sont nécessaires pour assurer les besoins énergétiques de l'organisme. Au contraire, le rôle du mécanisme hydrolytique serait plutôt de "débarrasser" le système vacuolaire du glycogène (qui a pénétré par autophagie) que de former du glucose libre (107).

Sur le plan quantitatif, l' α -1,4-glucosidase acide présente dans le foie humain normal permet la formation d'environ 0,3 μ mole de glucose par minute à partir du glycogène si la concentration de ce dernier est de 0,4 %. La réaction est alors du premier ordre et la possibilité d'atteindre un taux d'hydrolyse comparable à celui de la phosphorolyse existe quand la concentration du glycogène dans les lysosomes est de l'ordre de 2 %.

La *régulation* de la voie hydrolytique est de deux types :

. Régulation non hormonale :

A concentration saturante en ions, l'action de l'enzyme sur le glycogène dépend beaucoup de la concentration de ce polysaccharide et de sa structure. En général, l'activité catalytique maximale est observée pour des concentrations élevées en glycogène. Ces concentrations pourraient exister dans le microenvironnement du lysosome.

Rappelons que l'action de l' α -glucosidase sur le glycogène est influencée de manière importante par les *cations mono - et divalents* (125). Cet effet est *pH dépendant* (183). JEFFREY et coll. (125) pensent donc que le catabolisme du glycogène *in vivo* pourrait être contrôlé par la concentration en cations, par le pH ou par les deux facteurs à la fois.

L'inhibition de type compétitif exercée par le *glucose* pourrait avoir un rôle physiologique puisque la K_i du glucose est voisine de la concentration de ce monosaccharide dans les milieux biologiques.

. Régulation hormonale :

L'injection d'*adrénaline* augmenterait l'activité de l' α -1,4-glucosidase acide dans le foie et le muscle squelettique (dans le coeur, il y a inhibition de cette activité). Cette augmentation étant très rapide (une minute après injection), il semble que l'hormone induise une activation de l'enzyme plutôt qu'une synthèse accrue (194). Classiquement, l'adrénaline active aussi la phosphorylase. La *nor-adrénaline* inhibe l'enzyme dans tous les tissus.

L'*insuline* n'aurait pas d'effet sur l' α -glucosidase de foie de lapin, ni le *glucagon* sur l'enzyme de foie de rat (194).

La *thyroxine* participe probablement d'une manière importante à la régulation de l'activité de l' α -glucosidase acide. En effet, HURWITZ, MC CORMICK et ALLEN (120) décrivent en 1970 un cas de myopathie hypothyroïdienne sévère dont l'étude biochimique musculaire montre une activité en maltase acide très abaissée (les autres activités enzymatiques sont normales). Après 6 mois de traitement à la L-thyroxine, l'activité de l' α -glucosidase se normalise. KOSTER (136) confirme

l'influence des hormones thyroïdiennes sur l'activité de l' α -1,4-glucosidase en montrant que les rats traités à la L-thyroxine possèdent une activité maltasique acide plus élevée dans le foie et les leucocytes que les rats témoins.

Enfin, l'injection de *cortisone* élève l'activité de l' α -glucosidase hépatique chez le rat. Cette augmentation est aussi rapportée dans les lysosomes isolés et dans les fibroblastes cutanés (24) (25). Après traitement des lysosomes par la cortisone, la liaison du maltose à la maltase acide n'est pas affectée mais le stéroïde augmente la valeur de la V_{max} . La membrane lysosomiale intervient dans cette activation.

Le rôle physiologique de la maltase acide est donc très important ; la meilleure preuve en est donnée par les conséquences pathologiques entraînées par le déficit de cette enzyme.

CHAPITRE III

LE DEFICIT EN ALPHA-1,4-GLUCOSIDASE ACIDE ET SES CONSEQUENCES

Comme l'a montré HERS en 1963 (101), le déficit en α -1,4-glucosidase acide est à l'origine de la glycogénose de type II ; la première description détaillée de cette glycogénose fut donnée par POMPE en 1932 (186).

III.1. PLACE DE LA GLYCOGENOSE DE TYPE II PARMI LES AUTRES GLYCOGENOSES (117) (200)

Les *glycogénoses* recouvrent des affections caractérisées par une anomalie du contenu tissulaire en glycogène ; il est généralement augmenté (sauf dans une forme de glycogénose où il est diminué), et dans certains cas présente une structure anormale.

Les glycogénoses sont le plus souvent dues au déficit d'une enzyme qui participe au métabolisme du glycogène. Cependant, l'accumulation du glycogène est parfois secondaire à un trouble indépendant du métabolisme de ce polysaccharide (syndrome de MAURIAC).

La classification numérique des glycogénoses proposée par CORI (44) et complétée par BROWN et BROWN (27) est présentée dans le tableau VII. Le niveau du blocage enzymatique perturbant le métabolisme du glycogène dans ces affections est précisé dans la figure n° 5.

La glycogénose de type II, caractérisée par le déficit d'une enzyme lysosomiale, constitue une entité particulière au sein des autres glycogénoses. La fréquence relative de la glycogénose de type II par rapport aux autres glycogénoses identifiées était en 1972 de 14,9 % (sur 316 cas de glycogénoses) dans le laboratoire des Professeurs HERS et VAN HOOFF (233) et en 1968 de 17 % dans celui de BROWN et BROWN (pour 155 cas) (27). Dans ces deux laboratoires, la glycogénose de type II est plus rare que celle de type VI, de type I et de type III.

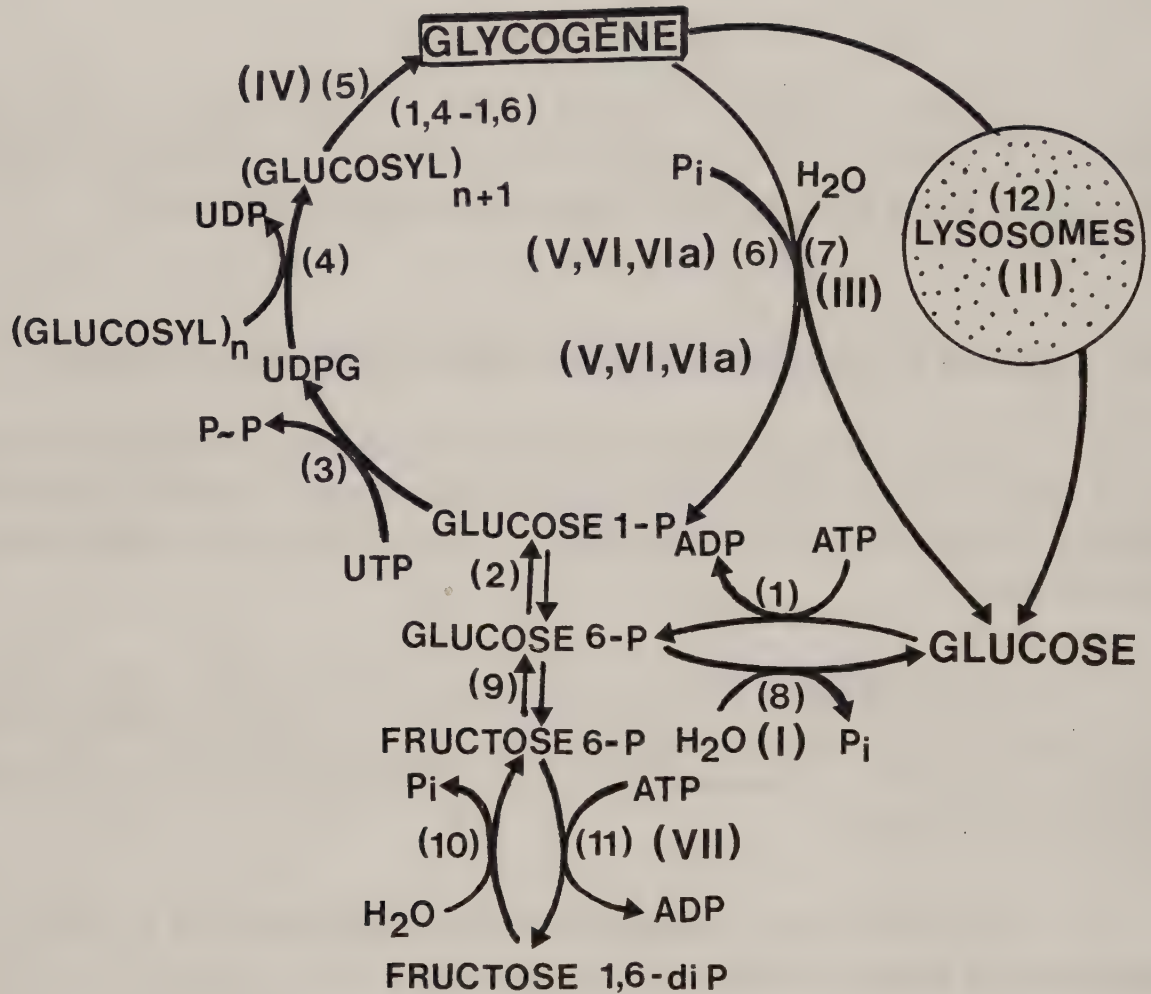


Fig. 5. LE METABOLISME DU GLYCOGÈNE (d'après de BARSY, 1976)

Les chiffres romains se rapportent au type de glycogénose et les chiffres arabes à l'enzyme catalysant la réaction. (1) glucokinase, (2) phosphoglucomutase, (3) UDPG-pyrophosphorylase, (4) glycogène synthétase, (5) enzyme ramifiant, (6) phosphorylase, (7) amylo-1,6-glucosidase, (8) glucose-6-phosphatase, (9) hexose-phosphate isomérise, (10) fructose-diphosphatase, (11) phosphofructokinase, (12) α-glucosidase acide.

TABLEAU VII

CLASSIFICATION DES GLYCOGENOSES D'APRES CORI (44) ET BROWN ET BROWN (27)

Dénomination	Déficit enzymatique	Principaux tissus atteints
maladie de VON GIERKE	Glucose-6-phosphatase	foie - rein
<u>maladie de POMPE</u>	<u>Alpha-glucosidase acide</u>	<u>atteinte généralisée</u>
maladie de FORBES	Amylo-1,6-glucosidase	foie, muscle, globules rouges et leucocytes
maladie d'ANDERSEN	enzyme branchant	foie
maladie de MAC ARDLE	phosphorylase musculaire	muscle
maladie de HERS	phosphorylase hépatique	foie, globules rouges et leucocytes
maladie de HUIJING	phosphorylase-b-kinase	foie, globules rouges et leucocytes
maladie de TARUI	phosphofructokinase	muscle, globules rouges

III.2. LA GLYCOGENOSE DE TYPE II

III.2.1. Historique

En 1864, VIRCHOW (234) décrit un cas de "cardiomégalie idiopathique" rapidement mortelle. Les tissus cardiaques présentent un aspect "multivacuolaire" à l'examen histologique. SEIFFERT (210) rapporte une observation comparable et pense à un "rhabdomyome embryonnaire diffus". Un aspect identique du coeur est retrouvé par SCHMINCKE en 1922 (208) chez un nourrisson décédé dans un tableau d'insuffisance cardiaque.

En 1932, POMPE (186) publie un autre cas "d'hypertrophie cardiaque idiopathique", chez un nourrisson atteint d'hypotonie musculaire extrême décédé à l'âge de 7 mois d'une défaillance cardiaque. A l'autopsie, le coeur pèse 190 g (le poids normal à cet âge est de 36 g). La recherche cytochimique du glycogène révèle une *accumulation de ce polysaccharide*, non seulement au niveau du coeur mais aussi dans le foie, les reins et les muscles squelettiques. Pour POMPE, certains "rhabdomyomes diffus" du coeur comportant un aspect histologique "vacuolaire" seraient, en fait, des surcharges primitives en glycogène entraînant progressivement l'accroissement du volume du coeur et des troubles fonctionnels de cet organe. L'auteur pense à un trouble de la glycogénolyse "fermentative" et parle "d'anenzymatose" ou "d'hypenzymatose" à propos de la maladie qui porte son nom.

La même année, BISCHOFF (21) et PUTSCHAR (188) rapportent un cas similaire.

En 1939, GUNTHER (95) suit un malade atteint "d'amyotrophie congénitale". L'enfant meurt à 11 mois. A l'autopsie, le glycogène est très augmenté dans les muscles et dans le système nerveux central, et plus discrètement dans le coeur qui est peu augmenté de volume.

En 1950, DI SANT'AGNESE et coll. (65) (66) décrivent deux nouveaux cas et à l'occasion de la revue des 14 cas de la littérature, ils énoncent les quatre critères permettant le diagnostic clinique de cette affection : hypotonie musculaire, amyotrophie, cardiomégalie et macroglossie (dans un tiers des cas seulement). DI SANT'AGNESE parle de "Glycogen storage disease of the heart" pour opposer cette maladie à l'autre glycogénose connue à cette époque, la glycogénose

de VON GIERKE ou glycogénose à prédominance hépatique.

En 1955, ZELLWEGER et coll. (247) publient le cas d'un enfant présentant un syndrome identique à la maladie de POMPE, mais dont la survie est de 3 ans et 10 mois ; son frère atteint de la même affection meurt à l'âge de 5 mois.

En 1963, LEJEUNE et HERS (150) découvrent l' α -1,4-glucosidase acide dans les cellules de foie de rat. La même année, HERS (101) fait la preuve du déficit en *maltase acide* dans les tissus des sujets atteints de glycogénose de type II.

En 1964, BAUDHUIN et coll. (13) tentent une thérapeutique substitutive dans l'affection par injection d'extraits d'*Aspergillus niger* riches en maltase acide.

Les premiers cas de formes atypiques de glycogénose de type II sont décrits en 1965 (46) (248).

III.2.2. Terminologie

Avec HERS et de BARSY (107), nous regrouperons sous le terme de glycogénose de type II toutes les expressions cliniques du déficit en maltase acide.

Le terme de *maladie de POMPE*, synonyme de glycogénose cardiomusculaire, sera réservé à la forme infantile avec atteinte cardiaque dans laquelle la mort survient avant l'âge de 2 ans.

A côté de la maladie de POMPE classique, il existe des déficits en maltase acide qui ne se révèlent que dans la seconde enfance, l'adolescence ou l'âge adulte. Nous parlerons alors de *formes atypiques* de glycogénose de type II.

Ces formes atypiques sont très différentes sur le plan clinique, morphologique et biochimique de la maladie de POMPE. Aussi, traiterons-nous séparément ces deux formes du déficit enzymatique.

III.2.3. La maladie de POMPE

III.2.3.1. Fréquence - Génétique

En Belgique, la fréquence de la maladie serait au moins de 1/150.000

naissances.(107)

Le déficit se transmet sur le mode autosomique récessif. Néanmoins, il semble exister une légère prépondérance du sexe masculin (60 % des cas).

III.2.3.2. Etude clinique

Les *signes de la maladie* apparaissent dès les premières semaines de la vie. Dyspnée, cyanose péribuccale et infections pulmonaires sont fréquentes. L'enfant s'alimente mal, l'hypotrophie pondérale est de règle.

. *L'examen clinique* montre un aspect du visage très caractéristique : l'enfant a la bouche entrouverte, la langue est augmentée de volume avec protrusion (52). La peau est pâle.

L'hypotonie est d'emblée généralisée avec attitude de "batracien" ; l'hypotonie musculaire est parfois si prononcée qu'elle peut faire évoquer le diagnostic d'atrophie musculaire spinale infantile et familiale de WERDNIG-HOFFMAN.

La cardiomégalie est importante, elle s'accompagne de tachycardie.

L'hépatomégalie est présente, mais parfois discrète ; elle relève à la fois de l'infiltration glycogénique et de l'insuffisance cardiaque.

Les malades poussent un cri plaintif et présentent des troubles de la déglutition (247). Ce syndrome pharyngo-oesophagien peut être dû à une atteinte des muscles du larynx ou du système nerveux central. Des troubles digestifs importants peuvent survenir (171).

L'évolution se fait vers la mort au cours de la première année dans un tableau d'insuffisance cardio-respiratoire. Certains enfants meurent quelques heures ou jours après la naissance.

. *L'examen radiologique* du thorax met en évidence un coeur très augmenté de volume (coeur en "boule"). La cardiomégalie peut masquer tout le champ pulmonaire gauche.

. *L'électrocardiogramme* est perturbé, mais non spécifique (88) (33). Un raccourcissement de l'espace PR, une inversion de l'onde T sont observés.

Le cathétérisme cardiaque et l'angiocardiographie permettent d'écarter une malformation anatomique du coeur ou des artères et de visualiser l'épaississement de la paroi musculaire (100) (180) et parfois une sténose aortique secondaire (11).

L'*électromyogramme* révèle une atteinte myogène sans altération de la vitesse de conduction motrice ou sensitive (52). Des décharges myotoniques et des fibrillations non expliquées se produisent parfois sur le tracé (52) (197).

On ne fait plus la distinction entre maladie de POMPE et maladie de GUNTHER dans laquelle l'atteinte musculaire prédomine.

III.2.3.3. Etude morphologique (52)

III.2.3.3.1. *Etude macroscopique :*

A l'autopsie, la *cardiomégalie* est nette. La paroi ventriculaire est épaissie surtout du côté gauche. L'*hépatomégalie* est d'une importance variable. La langue et le diaphragme sont hypertrophiés.

III.2.3.3.2. *Etude en microscopie optique et histochimie :*

Après coloration au *Carmin de Best* ou par le PAS (periodic acid - Schiff), la surcharge glycoogénique est visible dans presque tous les organes (coeur, muscle squelettique, foie, système nerveux, rein, ...).

L'aspect particulier "en dentelle" du coeur et du muscle rapporté par les premiers auteurs s'explique par la dissolution du glycogène dans les fixateurs aqueux qui étaient alors utilisés.

L'endocarde est épaissi (63).

Les fibres musculaires sont le siège d'un profond remaniement. Quelques rares fibres demeurent intactes, mais la plupart ont perdu leur striation.

Des *substances basophiles et métachromatiques* sont également mises en évidence dans les tissus des sujets atteints de maladie de POMPE (155). Ces substances sont surtout localisées dans les muscles. Leur origine est très discutée. Pour CHILDS et coll. (40), elles traduiraient une dégénérescence du muscle. D'autres auteurs relient ces substances au glycogène du fait de la double coloration PAS - bleu alcian (87) et de la disparition de ces produits après traitement par l'amylase

salivaire (37) (77). Il pourrait s'agir également de mucopolysaccharides acides (209). Les groupements phosphates seraient responsables de la métachromasie.

Des leucocytes vacuolaires ont été observés par SAKURAI et coll. (201).

III.2.3.3.3. *Etude en microscopie électronique :*

En 1964, en étudiant le foie d'un malade, BAUDHUIN et coll. (13) décrivent l'aspect ultrastructural typique de la glycogénose de type II. L'accumulation de glycogène dans les hépatocytes et les cellules de Kupffer est très importante et la localisation du polysaccharide est double : une partie du glycogène est dispersée dans le cytoplasme à un taux un peu plus élevé que dans le foie normal, mais la plus grande partie est enfermée dans des vacuoles limitées par une membrane unique. BAUDHUIN et coll. (13) pensent que *ces vacuoles bourrées de glycogène sont des lysosomes.* ; cette hypothèse s'appuie également sur les travaux de HERS (101) : le déficit en maltase acide doit, en effet, logiquement entraîner une accumulation de glycogène dans les lysosomes. La forme des lysosomes thésaurisateurs est très variable et leur taille peut atteindre 8 μ .

Cet aspect ultrastructural du foie a été confirmé par de nombreux auteurs (30) (86) (100).

Les muscles squelettiques et le coeur sont également le siège de bouleversements importants (37). Les myofibrilles peuvent disparaître pour laisser la place à des vacuoles ou à des "flaques" de glycogène ; dans d'autres fibres musculaires, seulement quelques lysosomes remplis de glycogène écartent les myofibrilles. Certaines vacuolès renferment également un matériel osmiophile présentant le même aspect que la lipofuscine.

L'accumulation de glycogène intralysosomal est retrouvée dans de très nombreux tissus : le rein (30) (86) (239), le système nerveux (52) (160), la rétine (91), les lymphocytes (104), les cellules endothéliales des vaisseaux (86), les fibroblastes en culture (107) (114). Il est à noter que les cellules de l'intestin grêle ont une apparence normale, ce qui s'explique par la courte durée de vie de ces cellules (48).

III.2.3.4. Etude biochimique :

La biologie de la maladie de POMPE se distingue de celle des autres glycoséoses essentiellement par le fait que les malades ne souffrent pas d'*hypoglycémie* ; ils réagissent normalement à l'action de l'adrénaline et du glucagon. La lactacidémie et la lipémie sont normales.

Les activités de la *créatine kinase* et de l'*aldolase* dans le sérum sont presque toujours augmentées. L'élévation des transaminases est moins constante.

Mais, bien plus spécifiques de l'affection sont le contenu en glycogène et surtout l'activité de l' α -1,4-glucosidase acide dans les tissus des sujets atteints de glycoséose de type II.

III.2.3.4.1. *Le contenu en glycogène des tissus* (52) (107)

L'accumulation du glycogène est deux à trois fois plus élevée dans la maladie de POMPE que dans les autres glycoséoses.

Dans le muscle, HERS et coll. (107) trouvent une moyenne de $8,9 \text{ g } \% \pm 2,6$ du poids humide (31 cas, valeurs de référence : $0,9 \text{ g } \% \pm 0,6$). Dans les autres glycoséoses type III et V, la concentration en polysaccharide excède rarement 5g%.

Dans le foie, le taux de glycogène observé par ces mêmes auteurs est de $8,7 \text{ g } \% \pm 2,5$ (20 cas, valeurs de référence : inférieure à 6 g %), ce qui est comparable aux résultats obtenus dans la glycoséose type I et inférieur à ceux de la glycoséose de type III.

Dans le coeur, la concentration en glycogène est de 11,4 g % (sur quatre observations, valeur de référence : inférieure à 1 g %).

Le taux de glycogène dans les *fibroblastes en culture* varie en fonction des conditions de culture (52), mais il peut être 2 à 5 fois plus élevé que celui des témoins traités dans les mêmes conditions (52) (61).

BAUDHUIN et coll. (13) ont montré que la glycoséolyse post-mortem entraînait la disparition spécifique du glycogène libre et réduisait sa concentration de 3 ou 4 g %. Cette valeur peut être considérée comme la concentration de

glycogène extravacuolaire, ce qui correspond à une valeur normale. Le glycogène qui s'accumule présente généralement une *structure normale*, cependant KRIVIT et coll. (144) mettent en évidence chez un malade un glycogène à chaînes externes plus courtes.

III.2.3.4.2. L'étude enzymatique :

L'étude enzymatique des tissus d'enfants souffrant de maladie de POMPE révèle un *déficit généralisé* en α -1,4-glucosidase acide (101). L'enzyme est le plus souvent totalement absente du coeur, du muscle et du foie ; le déficit touche les activités α -1,4-glucosidasique , α -1,6-glucosidasique et transférasique (29).

Certains tissus et liquides biologiques présentent néanmoins une activité encore assez élevée. C'est le cas du rein, des urines et des leucocytes (30) (169) (172) (202). Ces résultats ne sont pas surprenants puisque, chez les sujets normaux, l'activité enzymatique de ces milieux biologiques n'est pas uniquement constituée de maltase acide lysosomiale (cf paragraphe II.4.1.). Ainsi, KOSTER et coll. (142) ont montré que, chez un malade, l'activité maltasique rénale mesurée à pH 4 n'était pas inhibée par des anticorps anti-maltase acide de foie humain.

Par l'utilisation d'anticorps anti-maltase acide humaine, il n'a pas été possible jusqu'à ce jour de mettre en évidence une protéine possédant les caractéristiques immunologiques de l'enzyme normale dans le foie ou le coeur des sujets atteints de glycogénose de type II (54) (137) (172). Ces expériences ont été effectuées selon la technique d'OUCHTERLONY ou par la technique de consommation des anticorps. de BARSY et coll. (54) pensent que les propriétés catalytiques et immunologiques de l' α -glucosidase acide sont étroitement liées puisque des résultats analogues à ceux des tissus malades sont observés après inactivation de l'activité catalytique de l' α -glucosidase hépatique humaine (incubation une heure à 37°C et à pH 8,5). Il est donc difficile de conclure de manière définitive sur la présence ou non d'une protéine catalytiquement inactive dans la maladie de POMPE.

L'hyperactivité de certaines enzymes lysosomiales a été signalée dans la plupart des maladies lysosomiales (106).

Dans le foie des malades atteints de maladie de POMPE, les activités de l' α -galactosidase et de la N-acétyl- β -hexosaminidase sont augmentées respectivement

de 3,8 et 2,6 fois par rapport aux valeurs de référence. La β -glycérophosphatase, la cathepsine D, l' α -fucosidase, la β -Galactosidase et la β -Glucuronidase sont fréquemment plus actives.

Les autres enzymes intervenant dans le métabolisme du glycogène sont normales (52) (157).

En 1975, LUCK et coll. (157) rapportent, en plus du déficit en α -1,4-glucosidase, un déficit en hyaluronidase dans le muscle squelettique, le coeur et le foie des malades. Les auteurs voient un rapport entre ce déficit et l'accumulation d'une substance mucopolysaccharidique.

III.2.3.5. Diagnostic de la maladie de POMPE (52)

III.2.3.5.1. Diagnostic postnatal :

Le diagnostic de la maladie de POMPE est relativement aisé après l'installation des signes cliniques. La triade hypotonie, cardiomégalie et hépatomégalie est évocatrice. Les malades ne sont jamais hypoglycémiques.

La radiographie du thorax, l'électrocardiographie et l'électromyographie apportent des renseignements précieux.

L'hypotrophie musculaire associée à un électrocardiogramme de type myogène conduit à pratiquer une *biopsie musculaire* sur laquelle seront effectuées des études histologiques, histochimiques, ultrastructurales, et enzymatiques :

. étude histologique :

Les fibres musculaires ont perdu leur striation et sont le siège d'une myopathie vacuolaire.

. étude histochimique :

Les vacuoles observées précédemment renferment du glycogène (coloration au PAS ou au Carmin de Best).

. étude ultrastructurale :

La microscopie électronique met en évidence une surcharge glycogénique à la fois dans le cytoplasme et dans les lysosomes. Parfois, la surcharge intra-

cytoplasmique est prédominante : elle pourrait être liée à une accumulation intense du glycogène dans les lysosomes qui provoquerait leur rupture ; elle pourrait aussi être également consécutive à un artefact de préparation.

. étude enzymatique :

Le taux de maltase acide est nul dans presque toutes les observations.

La biopsie hépatique apporte peu d'éléments supplémentaires. Le glycogène accumulé est sous forme monogranulaire ou en rosettes.

Les cellules dermiques peuvent être utilisées de deux façons :

. non cultivées :

Les cellules, examinées en microscopie électronique, renferment des vacuoles remplies de glycogène (113) et elles sont déficitaires en maltase acide (148).

. cultivées :

Les fibroblastes cutanés en culture constituent un matériel de choix ; l'activité de l' α -glucosidase acide dans ces cellules est nulle (49) (52) (61) (151) (181). L'étude ultrastructurale des fibroblastes révèle la présence de très nombreuses vacuoles intracellulaires qui ressemblent aux lysosomes anormaux des autres tissus de ces malades. Les fibroblastes témoins ne possèdent pas de telles vacuoles (52) (114).

HUIJING et coll. (118) proposent la détermination de l'activité maltasique acide *leucocytaire* pour le diagnostic de la glycogénose de type II. Cette activité enzymatique est généralement très abaissée (26) (142) (180) (198) (220), mais non nulle. Cependant, comme le soulignent KOSTER et coll. (142), les polynucléaires présentent encore une activité non négligeable, avec le maltose comme substrat. Avec le même substrat, le déficit est plus prononcé dans les lymphocytes. Avec le substrat glycogène, les polynucléaires comme les lymphocytes présentent une activité très faible (142). Il est probable que l'activité résiduelle mesurée à pH 4 est due à la maltase neutre (142). Le rapport de l'activité maltasique acide sur l'activité maltasique neutre a également été utilisé pour le diagnostic de la maladie de POMPE (142).

En fait, comme l'a très bien montré de BARSY (52) (53), l'activité enzymatique leucocytaire n'est utilisable que si cette activité est déterminée en

présence d'anticorps spécifiques (52). Contrairement aux sujets témoins, l'activité maltasique leucocytaire mesurée à pH 4 n'est pas inhibée, chez les malades après addition d'anticorps spécifiques antimaltase acide ce qui prouve la nature non lysosomiale de l'activité résiduelle. L'étude des lymphocytes en microscopie électronique met en évidence la présence de vacuoles chargées de glycogène (104).

SALAFSKY et NADLER (205) considèrent que la détermination de l'activité enzymatique dans les *urînes* est très utile au diagnostic de maladie de POMPE. L'activité maltasique mesurée à pH 4 est significativement diminuée. D'après SALAFSKY et NADLER, l'évaluation du rapport de l'activité α -glucosidasique à pH 4 sur celle mesurée à pH 6 permet de différencier plus aisément les malades (rapport 0,2 et 0,4 pour deux malades) des sujets témoins (rapport supérieur à 1,2). En outre, le pH optimum d'activité de l'enzyme urinaire est situé vers pH 6, et l'inhibition par le turanose n'est que de 50 % environ (plus de 77 % pour les témoins). Comme pour les leucocytes, les résultats les plus fiables sont obtenus après l'étude de l'inhibition de l'activité enzymatique par des anticorps spécifiques (52).

III.2.3.5.2. *Diagnostic prénatal :*

En 1969, NADLER et MESSINA (173) publient les premiers résultats de la détermination de l'activité α -1,4-glucosidasique dans le liquide amniotique, les cellules amniotiques et les cellules amniotiques en culture. Les auteurs ont suivi huit grossesses chez des femmes ayant mis au monde des enfants souffrant de maladie de POMPE. Les ponctions amniotiques ont été effectuées entre les quatorzièmes et seizièmes semaines de gestation. Dans un seul cas, un déficit en α -1,4-glucosidase acide a été retrouvé dans le liquide amniotique, les cellules amniotiques et les cellules amniotiques en culture : l'examen du fœtus a prouvé qu'il était effectivement malade.

L'examen enzymatique du liquide amniotique est à *proscrire* pour le diagnostic prénatal de la glycogénose de type II. FLUHARTY et coll.(80) ont montré que ce liquide renfermait une α -glucosidase non lysosomiale et active à pH 4. En 1970, NADLER et coll.(174) illustrent parfaitement le manque de fiabilité de l'étude de l' α -1,4-glucosidase dans le liquide amniotique : en effet, dans un cas de maladie de POMPE, ils ont obtenu une activité normale dans le liquide amniotique alors qu'aucune activité n'était détectable dans les cellules amniotiques en culture.

COX et coll.(47) insistent sur la possibilité d'une contamination du liquide amniotique par des cellules maternelles. Toutefois, NADLER et coll. (174), HUG et coll.(113), SCHAUB et coll.(207) ont pu mettre en évidence en microscopie électronique des lysosomes remplis de glycogène dans les cellules amniotiques prélevées chez des femmes porteuses d'un foetus malade.

La détection prénatale n'est donc réalisable de manière fiable que par l'étude enzymatique des cellules amniotiques en culture (84) (174) (179) (203) (207). L'utilisation du MU-glucoside ainsi que la miniaturisation des techniques de dosage ont contribué à rendre le diagnostic prénatal de la maladie de POMPE fiable et rapide (78) (84). C'est ainsi que GALJAARD et coll.(84) peuvent effectuer ce diagnostic sept à dix jours après le prélèvement d'un liquide amniotique correspondant à une grossesse de quatorze à seize semaines.

III.2.3.5.3. Détection des hétérozygotes :

Malgré la rareté de l'affection, la détection des hétérozygotes doit être envisagée. Chez ceux-ci, l'activité enzymatique dans les différents tissus devrait être théoriquement diminuée de moitié par rapport aux sujets témoins. Le muscle, les fibroblastes et les leucocytes ont surtout été étudiés dans le but d'établir le diagnostic d'hétérozygotie.

Pour ENGEL et GOMEZ (73), ce diagnostic peut être affirmé sur l'examen enzymatique des *biopsies musculaires*. Les valeurs de l'activité α -1,4-glucosidase musculaire (substrat : maltose 5 mM) des parents d'enfants atteints de glycogénose de type II sont sans recouvrement avec celles des sujets témoins ; la moyenne des valeurs des sujets examinés est inférieure à la moitié de celle des témoins.

Dans les *fibroblastes cutanés* en culture, NITOWSKY et GRUNFELD (181) rapportent des valeurs abaissées chez une mère de trois enfants atteints de glycogénose de type II.

L'étude des *leucocytes* a été proposée par KOSTER et coll.(139) pour différencier les témoins, les hétérozygotes et les homozygotes. D'après ces auteurs, la différenciation est possible grâce à la détermination du rapport de l'activité maltasique acide sur l'activité maltasique neutre avec le substrat glycogène.

La meilleure technique de détection des hétérozygotes semble être la détermination de l'activité enzymatique dans les lymphocytes après stimulation à la phytohémagglutinine (109). La phytohémagglutinine entraîne l'accroissement de l'activité des hydrolases lysosomiales ; or, chez les hétérozygotes, l'élévation de l'activité de l' α -glucosidase acide comparée à celle de la phosphatase acide est moins marquée que chez les témoins. Cependant, cette technique reste très délicate à réaliser.

de BARSY (52) pense qu'avec l'emploi d'anticorps spécifiques, il est possible d'apprécier la quantité réelle d' α -glucosidase acide des leucocytes.

III.2.3.6. Pathogénie (52) (107)

L'absence d' α -1,4-glucosidase acide dans la maladie de POMPE entraîne une accumulation du glycogène qui a pénétré dans les lysosomes par autophagie. Un gonflement des lysosomes se produit ce qui perturbe le fonctionnement normal des organes. Les muscles, le coeur et le système nerveux sont sévèrement touchés.

Le mécanisme exact qui produit la souffrance puis la mort cellulaire est encore obscur.

La présence de glycogène cytoplasmique extralysosomal a donné lieu à de nombreuses discussions. Il pourrait provenir de la rupture des lysosomes car des débris provenant de lysosomes ont été mis en évidence (en particulier, des fragments de membrane unitaire). L'hétérogénéité des dépôts propres aux maladies lysosomiales est peu marquée dans la maladie de POMPE.

III.2.4. Les formes atypiques de glycogénose de type II

III.2.4.1. Fréquence - génétique

Nous avons répertorié 68 cas de formes atypiques de glycogénose de type II dans la littérature (tableau VIII).

Comme dans la maladie de POMPE, il existe une légère prépondérance du sexe masculin (60 % des malades mais le sexe n'est précisé que dans 55 cas). Des antécédents familiaux sont assez souvent retrouvés. Ces résultats sont en

TABLEAU VIII

RESUME CLINIQUE DES OBSERVATIONS DE LA LITTERATURE

N°	AUTEUR	ANNEE	SEXE	DEBUT AFFECTION	AGE DU DIAGNOSTIC	TROUBLES MARCHES	ATEINTE CEINTURES		TROUBLES RESPIRATOIRES	HEPATOMEGALIE	CARDIOMEGALIE	DIVERS	EMG	ECG	ANTECEDENTS
							pelvienne	scapulaire							
1	ZELLWEGER et coll. (248)	1965	M		15 ans	+				-	-	hypotonie musculaire	type myopathique	N	frères oncle ?
2	ZELLWEGER et coll. (248)	1965	M		4 ans 1/2	-				-	-	hypotonie musculaire	N		
3	COURTECUISSE et coll. (46)	1965	M	4 ans	14 ans (+ 19 ans)	+ dandinante		+		-	-		myogène	N	0
4	ISCH et Coll. (122)	1966	F	2 ans	6 ans	+				+ transitoire	-		fibrillations myogène	rythme sinusal	parents consanguins oncle ?
5	SMITH H.L. et Coll. (216)	1966	F	18 mois	3 ans 1/2 (+ 5 ans)	+				-	+	protrusion de la langue	type myogène	anormal	0
6	BROWN et ZELLWEGER (26)	1966	?	?	10 ans (autopsie)							asthénie muscu- laire généralisée			?
7	SMITH J. et Coll. (217)	1967	M	5 mois	3 ans 1/2 (+ 11 ans)	+ dandinante			+	-	-		myogène	N	?
8	BADOUAL et Coll. (9)	1967	F	2 ans	2 ans 8 mois	+			+	+	-	hypotonie musculaire		N	?
9	SWAIMAN et Coll. (223)	1968	M	23 mois	2 ans	+				-	-		fibrillation	N	0

10	FIDZIANSKA et coll. (79)	1968	F	16 ans	19 ans (+ 19 ans)												troubles osseux		insuffi- -sance cardiaque	?
11	HUDGSON et coll. (110)	1968	F	7 ans	19 ans (+ 19 ans)	+ dandinante											scoliose	-	myogène	frère?
12	HUDGSON et coll. (110)	1968	F	31 ans	44 ans	+ dandinante											Macroglissie	-	type myogène	0
13	HERS et VAN HOOF (104)	1968	H		10 ans (+ 11 ans)	+													N	?
14	HERS et VAN HOOF (104)	1968	H		13 ans												faiblesse musculaire (tronc)	+		
15	ENGEL et DALE (74)	1968	M	36 ans	46 ans	+ dandinante											faiblesse musculaire	-	myogène	père ?
16	ENGEL (72)	1970	F	31 ans	44 ans	+												-	N	0
17	ENGEL (72)	1970	F	24 ans	25 ans												insuffisance musculaire	-	pseudo Hyotonique	
18	ENGEL (72)	1970	M	25 ans	33 ans	+													anormal	0
19	ERDSLOH et coll (76)	1970	F	23 ans	32 ans (+ 35 ans)												myogène	-		2 soeurs +

TABLEAU VIII

RESUME CLINIQUE DES OBSERVATIONS DE LA LITTÉRATURE (suite)

N°	AUTEUR	ANNEE	SEXE	DEBUT AFFECTION	AGE DU DIAGNOSTIC	TROUBLES MARCHÉ	ATTEINTE CEINTURES		TROUBLES RESPIRATOIRES	HEPATOMEGALIE	CARDIOMEGALIE	DIVERS	EMG	ECG	ANTECEDENTS
							pelvienne	scapulaire							
10	SENGEL et coll. (214)	1971	M	2 ans	40 ans (+ 42 ans)		+	+		+	-	atteinte musculaire proximale	myogène		0
1	SENGEL et coll. (214)	1971	F		40 ans							atteinte musculaire proximale	myogène		
2	CANAL et coll. (35)	1971	M	3 ans	7 ans	dandinante				-	-	faiblesse musculaire protrusion langue	pseudo- myotonique	N	soeur atteinte
3	ANGELINI et ENGEL (1)	1972	M	3 ans	6 ans (+ 6 ans 1/2)		+	+	+	-	-			N	cousin ?
	ANGELINI et ENGEL (1)	1972	M	40 ans	45 ans		+								
	ANGELINI ET ENGEL (1)	1972	F	25 ans	30 ans		+	+							
	ANGELINI et ENGEL (1)	1972	M	56 ans	58 ans (+ 60 ans)			+	++					N	
	NEVSINAL et KOCURA (178)	1973	F	15 ans	17 ans							hypotonie distale	?		0
	KETELSEN et Coll. (133)	1973	M	4 ans	7 ans	+							myogène	anormal	frère et soeur

[illegible]

TABLEAU VIII

RÉSUMÉ CLINIQUE DES OBSERVATIONS DE LA LITTÉRATURE (suite)

[illegible]

faveur d'une transmission de l'affection selon le *mode autosomique récessif* ; dans certains cas, les hétérozygotes ont pu être identifiés par l'étude enzymatique des urines ou des biopsies musculaires (73) (168).

III.2.4.2. Etude clinique

III.2.4.2.1. *Age d'apparition :*

Les premières manifestations cliniques de la maladie sont observées à un âge très variable allant de 6 mois à 56 ans (tableau VIII). On trouve donc un spectre complet s'étendant de la maladie de POMPE à la forme musculaire pure de l'adulte, en passant par la forme juvénile. La frontière séparant la maladie de POMPE de la forme atypique de glycogénose de type II est parfois difficile à préciser (197) (247).

III.2.4.2.2. *Les premiers signes cliniques :*

Les troubles de la marche et l'atteinte des ceintures scapulaire et pelvienne attirent l'attention. Le cas n° 2 (248), qui ne présente pas de troubles de la marche fait exception. L'affection peut débuter par des signes d'insuffisance respiratoire (cas n° 17, 26 et 61).

III.2.4.2.3. *Les signes cliniques de la maladie constituée :*

L'hypotonie et l'asthénie musculaire sont les signes révélateurs de la maladie ; elles induisent les troubles de la marche.

L'atteinte musculaire est surtout proximale, la ceinture pelvienne étant plus touchée que la ceinture scapulaire. Les muscles distaux (extrémités, avant-bras, jambes) ont le plus souvent une apparence et une force normales.

Les muscles du tronc sont atteints et principalement les *muscles respiratoires*, ce qui entraîne la mort du malade.

La musculature lisse est également touchée : hypotonie du sphincter anal (cas n° 4 et 9), troubles de la déglutition (cas n° 11).

Une *macroglossie* véritable n'est observée que dans le cas n° 12. Dans les cas 5 et 22, on note seulement une protrusion de la langue.

La *cardiomégalie* est rare (trois cas), l'hépatomégalie est un peu plus fréquente (huit cas).

L'intelligence est normale dans la majorité des cas.

En résumé, les malades présentent un syndrome de *dystrophie musculaire progressive*. L'évolution de l'affection est lente ; néanmoins, le pronostic fonctionnel et vital à long terme est très réservé.

III.2.4.2.4. Les examens paracliniques :

La *radiographie* du thorax et l'*électrocardiogramme* sont le plus souvent normaux dans la mesure où le sujet ne développe pas des complications pulmonaires.

C'est l'*électromyogramme* qui apporte le plus d'enseignements. Le tracé est de type myopathique. Des signes d'irritabilité électrique (potentiels de fibrillation, décharges myotoniques ou plutôt pseudomyotoniques) sont souvent décrits.

III.2.4.3. Etude morphologique

III.2.4.3.1. Etude macroscopique (52) :

La *cardiomégalie* ou l'hépatomégalie peuvent exister chez les sujets qui meurent en bas âge, mais elles ne sont pas comparables à celles que l'on rencontre dans la maladie de POMPE.

Chez les adultes, la *viscéromégalie* est plus inconstante. Les masses musculaires sont fréquemment diminuées de volume.

III.2.4.3.2. Etude en microscopie optique et histochimie :

L'aspect histochimique des tissus musculaires est celui d'une *myopathie vacuolaire* ; l'essentiel des lésions est, en effet, constitué par une vacuolisation

des fibres musculaires. Les vacuoles, de forme irrégulière et de taille variable, sont le plus souvent de localisation sous-sarcolemmique (69) ; elles apparaissent, soit optiquement vides, soit remplies d'un matériel finement granulaire colorable au PAS ou au carmin de Best.

Les altérations des muscles squelettiques sont d'une très grande *variabilité* et ce trait est caractéristique de ces formes atypiques : les lésions histologiques observées varient beaucoup d'un muscle à l'autre, dans leur intensité ou avec la durée d'évolution de la maladie ; dans un même faisceau musculaire, des fibres malades peuvent coexister avec des fibres entièrement normales.

Des substances basophiles et métachromatiques sont également décrites mais en quantité beaucoup moins importante que dans la maladie de POMPE.

Dans le coeur et le foie, les lésions paraissent proportionnelles à l'augmentation de volume de ces organes.

Contrairement à la maladie de POMPE, il n'y a pas ou très peu d'accumulation de glycogène dans le *système nerveux central* (79) (161) (162) (217).

PRALLE et coll. (187) signalent la présence de plasmocytes et de lymphocytes vacuolés chez les malades.

III.2.4.3.3. *Etude en microscopie électronique :*

Les lésions observées apparaissent analogues à celles décrites dans la maladie de POMPE ; *l'accumulation du glycogène est surtout intravacuolaire.*

La surcharge glycolénique peut s'observer dans les lymphocytes (53) et les fibroblastes en culture (52) (162).

III.2.4.4. Etude biochimique

Les résultats des examens biologiques courants sont peu modifiés dans les formes atypiques de glycolénose de type II. Cependant, on retrouve régulièrement une nette augmentation des activités de la *créatine kinase*, de l'*aldolase* et des *transaminases* dans le sérum. La *glycémie* est normale ainsi que les épreuves d'hyperglycémie provoquée au glucose ou à l'adrénaline.



Un fait remarquable apparaît à la lecture des cas publiés : c'est l'élévation de la *cholestérolémie*. Le constituant a été dosé dans quinze cas ; neuf fois, sa valeur a été trouvée augmentée ; cependant, parmi les six malades ayant une cholestérolémie normale, quatre présentaient des triglycérides anormalement élevés. GUTMANN (96) avait déjà noté cette modification, en 1970, en faisant la revue de quinze cas de la littérature.

L'accumulation du glycogène et le déficit en α -1,4-glucosidase présentent certaines particularités :

III.2.4.4.1. Le contenu en glycogène des tissus :

La concentration en glycogène du *muscle* est caractérisée par une grande *variabilité* d'un malade à l'autre : des résultats allant de 0,5 g % à 20 g % du poids humide sont rapportés (tableau IX). Cette variabilité existe également, chez un même malade, d'un territoire musculaire à un autre. Le cas n° 14 en est une illustration puisque la concentration du glycogène est de 0,8 g % dans un fragment musculaire et de 15 g % dans un autre.

Le polysaccharide accumulé présente parfois une *structure anormale* (26) (72) (162) (216) (217) : ses chaînes externes sont plus courtes. de BARSY (52) montre, en étudiant le spectre d'absorption du glycogène en présence d'iode selon la technique de KRISMAN (143), que cette anomalie de structure n'est pas retrouvée obligatoirement dans tous les tissus du malade (cas du malade n° 39).

Chez les adultes, le taux de glycogène musculaire est nettement inférieur à celui observé dans la maladie de POMPE. Seul, le malade n° 62 présente un taux supérieur à 7 g %.

Le *glycogène hépatique* a été moins étudié. Les concentrations (13 dosages) sont également très variables (de 0,43 g % à 17,7 g %). Six fois, la concentration du glycogène a été trouvée augmentée et, dans quatre cas, une discordance est notée entre le taux de glycogène hépatique qui est normal et celui du muscle qui est élevé.

Dans les *fibroblastes* et les *cellules musculaires* en culture, le taux de glycogène (rarement évalué) se situe à une valeur normale (5) (152).

III.2.4.4.2. l'étude enzymatique :

Le déficit en α -1,4-glucosidase acide est constant dans les formes atypiques de glycogénose de type II mais, à l'inverse de la forme infantile, rarement total.

Dans les *muscles atteints*, l'activité enzymatique mesurée à pH 4 varie de 0 à 25 % de la valeur normale. Parfois, il a été noté des discordances entre la fonction hydrolytique de l'enzyme qui est bien conservé et sa fonction transférasique qui est très diminuée (52) (104). Là encore, le phénomène n'est pas généralisé à tous les tissus, il est plus fréquent chez les jeunes enfants que chez l'adulte.

Dans le *foie*, le déficit est retrouvé mais, les valeurs de l'activité enzymatique ne sont pas toujours concordantes avec celles du muscle.

de BARSY (52) a montré que chez ces malades l'activité enzymatique résiduelle du muscle et du foie était inhibable par des anticorps spécifiques antimaltase acide humaine.

Chez certains sujets, la forte diminution de l'activité de la maltase acide contraste avec l'élévation très modérée du glycogène.

L'activité maltasique neutre mesurée à pH 6,5 est normale voire augmentée (135) (168).

Les *fibroblastes* cutanés en culture possèdent souvent une activité maltasique résiduelle relativement importante ; elle peut atteindre jusqu'à 24 % (214) de celle des lignées témoins. Les résultats des études cinétiques et immunologiques effectuées sur les fibroblastes de sujets malades sont superposables à ceux des contrôles (52). Cependant, l'activité spécifique de l'enzyme résiduelle ne s'élève pas avec l'âge de la subculture (52). DREYFUS et coll. (68) mettent en évidence une plus grande thermostabilité de l'enzyme "déficitaire" ; cette propriété n'est pas retrouvée par de BARSY (52).

L'activité maltasique *leucocytaire* mesurée à pH 4 est comprise entre 16 et 94 % de l'activité des témoins. Mais, comme nous l'avons déjà signalé, l'étude de l'activité des leucocytes doit être effectuée en utilisant des anticorps

TABLEAU IX

RESULTATS DES ANALYSES BIOCHIMIQUES DANS LES FORMES ATYPIQUES DE GLYCOGENOSE TYPE II

N°	DOSAGE DU GLYCOGENE		ACTIVITE DE L' α -1,4-GLUCOSIDASE						AUTRES CONSTANTES	
			MUSCLE		FOIE		LEUCOCYTES		FIBROBLASTES	
	MUSCLE	FOIE	pH=4,0	pH=6,5	pH = 4	pH= 6,5	pH = 4	pH= 6,5	pH = 4	pH = 6,5
1	1,4 g %		M : 8,5 %	M : 36%			M : 47 %			†GOT-†CK-†LDH-taldolase-†cholestérol (3,60g/l)
2	0,8 g %		M : 7 %	M : 46%			M : 36 %			†cholestérol (3g/l) GOT†-†CK-†LDH † aldolase
3	2,9 g %	1,8 g%	M : 3 %		M: 30 à 85% T: N					
4	2,2 g %		M : 10 %				M : ++			
5	14,1 g % (structure anormale)	2,3g%	M : 0		0					†GOT taldolase †cholestérol (2,39g/l)
6	- (structure anormale)		M : 0							
7	15 - 20 g % (structure anormale)	8,8 g%	M : 0		0					† GOT †cholestérol (2,12g/l)
8	14 g %	11 g%	M : 2 % T : 2 %		T : 0 M : 0					aldolase N-CK†-GOT† cholestérol 2,90g/l
9	2,8g %	2,2 g%	M : 0		M : 0					CK †
10										†Enzymes sériques †Cholestérol
11	5,6g %		M : 15 %							†GOT-†CK-taldolase †GPT
12	5,3g%		M : 25 %				M: 126% M: 111 %			GOT N-aldolase N-CK †

TABLEAU IX (suite)

RESULTATS DES ANALYSES BIOCHIMIQUES DANS LES FORMES ATYPIQUES DE GLYCOGENOSE TYPE II

N°	DOSAGE DU GLYCOGENE		ACTIVITE DE L'α-1,4-GLUCOSIDASE						AUTRES CONSTANTES
	MUSCLE	FOIE	MUSCLE		FOIE		LEUCOCYTES	FIBROBLASTES	
			pH = 4,0	pH=6,5	pH = 4	pH= 6,5	pH= 4	pH=6,5	
25	5,8 g%								pH = 4 : pH=6,5
26	0,9 g%	1,5g%	M : 10 %	M: 105%			M +		M : 15 %: M:96%
27					M : + histochimie:				
28									GOT, GPT, CK N LDH augmentée cholestérol normal
29									GOT, GPT, CK, LDH N cholestérol normal
30			M : 13 %	M : 72%					GOT, GPT, CK, LDH N
31	2,7 g%		M : 2,5 %	M: 188%					
32									
33									
34	14 g%		M : 0 %						
35	1,5 g% et 2,6 g%		M : 2 % M : 5 %				M: 29% +AC:29%	M : 21 % +AC:0,04%	

[illegible]

spécifiques antimaltase acide lysosomiale. L'activité enzymatique des leucocytes est inhibée par le turanose.

III.2.4.5. Diagnostic des formes atypiques de glycogénose de type II

Le diagnostic de ces affections est certainement souvent méconnu :

- la cardiomégalie et l'hépatomégalie sont assez peu fréquentes
- la prédominance de l'atteinte musculaire squelettique n'oriente pas vers une glycogénose de type II
- la variabilité des lésions d'un muscle à l'autre peut conduire à des résultats erronés.

Le diagnostic de certitude est établi sur l'étude de la *biopsie de muscle*. L'analyse histochimique et ultrastructurale permet de mettre en évidence l'accumulation de glycogène intravacuolaire. La détermination de l'activité de l' α -1,4-glucosidase acide apporte la preuve du déficit enzymatique. En cultivant des *cellules musculaires* à partir de biopsie du quadriceps, ASKANAS et coll. (5) reproduisent les mêmes lésions morphologiques et biochimiques que celles observées dans les biopsies.

Les *cultures de fibroblastes* confirment les résultats de la biopsie.

L'étude de l'activité des enzymes *leucocytaire et urinaire* peut être utilisée à condition d'employer des anticorps spécifiques antimaltase acide. MEHLER et DI MAURO (168) insistent sur l'intérêt des urines dans le diagnostic des formes atypiques de l'adulte ; chez ces sujets, l'excrétion urinaire de maltase acide est abaissée par rapport aux témoins, l'inhibition de l'activité par des anticorps antimaltase acide humaine est nulle (53 % pour les témoins) et l'influence du pH sur l'activité de l'enzyme urinaire montre la disparition du pic d'activité à pH 4.

Ces dernières mesures permettent de détecter des sujets *hétérozygotes* qui ont un comportement intermédiaire (inhibition à 30 % de l'activité enzymatique par des anticorps spécifiques) entre les sujets témoins et les malades.

III.2.5. Les tentatives thérapeutiques dans la glycogénose de type II

Un traitement symptomatique basé sur un régime *restrictif en hydrates de carbone* pour limiter la surcharge en glycogène et sur l'administration d'*adrénaline* pour mobiliser le glycogène, a été proposé par ENGEL et coll. (75) dans les formes atypiques de l'adulte. Une certaine amélioration de l'état clinique a été observée chez deux malades sur sept.

D'autres auteurs (178) (223) ont utilisé l'administration de *vitamine A* dans le but de détruire les membranes lysosomiales ; ainsi, le glycogène accumulé serait libéré et dégradé par les enzymes de la voie phosphorolytique. NEVSIMAL et coll. (178) sont les seuls à rapporter un effet favorable.

Le traitement de la glycogénose de type II par une *thérapeutique enzymatique substitutive* mérite un plus grand développement. de BARSY (52) a récemment envisagé ce sujet ; nous résumerons les points essentiels de ce travail.

Les maladies lysosomiales semblent se prêter particulièrement à une thérapeutique substitutive. L'enzyme administrée devrait, en effet, être captée activement par les lysosomes selon le mécanisme d'*endocytose*, et arriver au lieu même où son action est indispensable.

Les fibroblastes en culture constituent un excellent modèle expérimental. NEUFELD et coll. (176) ont pu corriger le déficit enzymatique lysosomal des cellules déficitaires par addition au milieu de culture de "facteurs de correction" constitués par les enzymes lysosomiales. Dans la glycogénose de type II, les premières tentatives de correction du déficit des fibroblastes en culture ont été réalisées par addition d'un extrait d'*Aspergillus niger* au milieu de culture (112). L'extrait enzymatique, enrobé dans des liposomes, entraîne une diminution de 50 % du glycogène global après son addition au milieu de culture (192). de BARSY (52) utilise de l' α -glucosidase acide placentaire purifiée pour la correction du déficit enzymatique des fibroblastes de malades atteints de glycogénose de type II ; les résultats biochimiques et morphologiques indiquent que la correction est possible et permettent donc d'envisager une thérapeutique substitutive *in vivo*.

Les premiers essais thérapeutiques furent entrepris, en 1964, par BAUDHUIN et coll. (13) qui injectèrent par voie intramusculaire un extrait

commercial d'*Aspergillus niger* renfermant de l' α -amylase, de l' α -amyloglucosidase et de la maltase. La maltase injectée est retrouvée dans le foie, mais les auteurs ne notent pas de changements ultrastructuraux des lysosomes anormaux. Des tentatives semblables furent entreprises par HUG et SCHUBERT (112) et par LAUER et coll. (147), mais les malades devaient décéder du fait de complications immunologiques.

L'injection intraveineuse d'enzyme humaine placentaire purifiée fut donc proposée (52) (233). Cette injection a été pratiquée dans deux cas de maladie de POMPE (52) : les 3/4 de l' α -1,4-glucosidase acide injectée (22 unités enzymatiques) pénètrent dans le foie, la demi-vie de l'enzyme est de cinq jours. Cependant, de BARSY n'observe pas de diminution du glycogène hépatique. L'enzyme n'est pas décelée dans les autres tissus.

Les tentatives de traitement de la glycogénose de type II apparaissent donc assez décevantes. On peut espérer que dans un proche avenir, l'enzyme humaine sera préparée en plus grande quantité. Le problème de sa pénétration dans le système nerveux et le muscle paraît très difficile à résoudre ; néanmoins, l'enrobage de l'enzyme dans les liposomes devrait faciliter sa capture par les cellules de l'organisme.

En attendant la mise au point d'un traitement efficace, la prévention qui repose sur le diagnostic prénatal, peut être proposée aux familles présentant un risque de glycogénose de type II.

Deuxième PARTIE

L'ALPHA-1, 4-GLUCOSIDASE ACIDE HUMAINE

Etude de l'enzyme normale placentaire purifiée et de l'enzyme résiduelle des formes atypiques de glycogénose de type II. Application diagnostique.

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES

I.1. MATERIEL

I.1.1. Les malades

Sept malades ont été étudiés. L'un d'entre eux présente une maladie de POMPE typique, alors que les six autres sont atteints d'une forme atypique de glycogénose de type II. L'histoire clinique de ces sujets est brièvement rapportée.

Patient n° 1 (malade du Pr BETHENOD - Service de Néonatalogie,
Hôpital DEBROUSSE - Lyon)

En Avril 1968, le petit Hubert CHA... est adressé dans le service du Pr BETHENOD à l'âge de 40 jours pour détresse respiratoire subaigue consécutive à une grippe. On ne note pas d'antécédents familiaux. Les parents, le frère et les trois soeurs du nouveau-né sont en bonne santé.

A la naissance, l'enfant présentait des oedèmes généralisés. Cependant, les premiers jours de la vie se sont déroulés normalement, sans cyanose, jusqu'à l'hospitalisation.

A l'entrée dans le service, Hubert est cyanosé avec une polypnée à 80 et une dyspnée expiratoire. Il tousse beaucoup. *L'hypotonie* musculaire devient vite manifeste. Les réflexes tendineux sont mal obtenus.

La radiographie met en évidence une *cardiomégalie* majeure. Il n'y a cependant pas de signes d'insuffisance cardiaque. Le foie n'est pas hypertrophié.

L'électrocardiogramme est anormal : rythme à 150, espace PR très court.

L'évolution se fait vers la défaillance cardiaque. Le décès de l'enfant survient trois semaines après son admission à l'hôpital.

L'observation complète a été publiée par BETHENOD et coll. (18).

Patient n° 2 : Christelle FAU... (malade du Dr FREYCON - CHU St Etienne)

Christelle FAU..., âgée de 3 ans et demi, est hospitalisée à la suite de la découverte, en juin 1972, d'une *hépatosplénomégalie* importante. Il n'y a pas de retard staturo-pondéral. Les examens cardiaque et neurologique sont normaux.

Sur le plan *neuro-musculaire*, l'enfant ne présente aucune gêne fonctionnelle apparente ; elle court sans difficulté, se relève une douzaine de fois de la position accroupie. Cependant, après un examen spécialement orienté, on note une discrète fatigabilité après une marche prolongée et quelques symptômes de faiblesse musculaire : pour passer de la position couchée à la position assise, l'enfant se tourne un peu de côté et s'aide d'une main au sol. L'examen musculaire est normal sauf au niveau des muscles abdominaux, lombaires, sternocléidomastoïdiens et des muscles des ceintures.

L'électrocardiogramme est dans les limites de la normale.

L'examen électromyographique met en évidence des signes discrets d'atrophie myogène sans décharges myotoniques.

L'enfant, revu en novembre 1975, à l'âge de 7 ans, présente un léger retard staturo-pondéral. L'hépatomégalie a tendance à régresser. La splénomégalie a disparu.

Sur le plan musculaire, l'activité physique reste normale. Les réflexes ostéo-tendineux et idiomusculaires sont obtenus. On note une discrète aggravation de la faiblesse musculaire. Les parents de Christelle sont en bonne santé. La soeur, Florence, a également été étudiée :

Patient n° 3 :

Florence est née en octobre 1973. Elle présente des difficultés d'alimentation transitoire entre le 10ème et le 39ème jour de vie avec têtées longues et difficiles. La survenue de fausse-routes motive l'hospitalisation de l'enfant en novembre 1973.

L'examen clinique montre une *hépatomégalie* discrète. L'examen neurologique est normal. Le coeur n'est pas augmenté de volume.

L'enfant est revu plus tard. Elle sourit à un mois, tient sa tête à deux mois, reste assise à huit mois et demi. A cet âge, les examens neurologique et musculaire sont normaux hormis le fait que la tête s'enfonce un peu dans les épaules quand l'enfant est soulevée sous les bras.

Le dernier examen de Florence date de novembre 1975. L'hépatomégalie persiste sans splénomégalie. On ne note pas de macroglossie. L'auscultation cardiaque est normale. L'activité physique n'est pas altérée. Cependant, comme le fait sa soeur, l'enfant prend appui d'une main pour passer de la position couchée à la position assise ; la tête s'enfonce un peu dans les épaules et on note une faiblesse des muscles abdominaux.

A *l'électromyogramme*, des signes discrets d'atrophie neurogène sont observés au niveau des quadriceps.

Les cas n° 2 et 3 ont déjà été publiés par BIENVENU et coll.(19).

Patient n° 4 (malade du Pr DEVIC, Hôpital NEUROLOGIQUE, Lyon) dont l'observation a été publiée par CARRIER et coll.(38)

Monsieur TER..., âgé de 58 ans, présente des *troubles musculaires pelviens* depuis plus de vingt ans.

A 35 ans, il court et monte les escaliers avec difficulté.

A 49 ans, il ne peut plus lever les bras en raison d'une *faiblesse scapulaire*. Les omoplates du sujet ont tendance à se décoller. La force des mains, des avant-bras et des jambes est conservée.

A la suite d'une chute, le malade ne peut plus quitter son lit.

L'examen clinique montre une faiblesse importante des muscles quadriceps, fessiers, adducteurs et abducteurs des cuisses. Les territoires musculaires les plus atrophiés sont ceux des quadriceps et des adducteurs.

Les muscles distaux des membres inférieurs ont un aspect normal. Aux membres supérieurs, les grands pectoraux sont atrophiques et à un degré moindre les deltoïdes, biceps et triceps.

L'atteinte faciale et sterno-cléido-mastoïdienne est légère.

Les muscles intercostaux et abdominaux sont normaux et il n'y a pas de troubles respiratoires.

Les réflexes ostéotendineux sont abolis alors que les réflexes idiomusculaires sont conservés.

L'examen cardiovasculaire est normal.

Il n'y a pas d'hépatomégalie ni de macroglossie.

L'électromyogramme (Dr Bady) montre une participation à la fois *neurogène et myogène* avec quelques fibrillations au repos. On ne note pas de salve myotonique.

Les *diagnostics* évoqués alors sont ceux de myopathie des ceintures ou de pseudomyopathie de KUGELBERG-WELANDER.

Le frère de ce malade, plus âgé que lui, présente une symptomatologie comparable. Le diagnostic de "myopathie atypique" fut porté, il y a une quinzaine d'années, lors d'une hospitalisation. Le sujet refuse actuellement la biopsie.

La soeur du patient est en bonne santé.

Patient n° 5 (malade du Pr GIRARD, Hôpital NEUROLOGIQUE, Lyon)

Monsieur ESC..., âgé de 52 ans, se plaint depuis l'âge de 35 ans d'une faiblesse *des ceintures pelviennes et scapulaires* avec gêne pour lever les bras et monter les escaliers.

A 40 ans, la démarche dandinante est celle d'un myopathe, abdomen en avant et tête rejetée en arrière.

A 42 ans, il ne peut plus exercer son métier d'agriculteur car les

chutes sont devenues trop fréquentes.

A 47 ans, il utilise des cannes pour se déplacer. Depuis, son état ne cesse de s'aggraver.

A l'examen clinique, on est frappé par l'atrophie de la ceinture pelvienne et surtout scapulaire avec décollement des omoplates. La force musculaire des extrémités des membres est excellente. Les réflexes tendineux sont abolis et les réflexes idio-musculaires sont en partie conservés.

La respiration et la déglutition sont normales.

Il n'y a pas d'hépatomégalie ni de cardiomégalie.

L'électromyogramme (Dr BADY) est de type mixte neurogène et myogène.

On ne note pas d'antécédents familiaux.

L'observation a été publiée par BIENVENU et coll. (19).

Patient n° 6 (malade du Pr BERTOYE, Hôpital de la CROIX-ROUSSE, Lyon)

Jean-Michel GIG... est hospitalisé en mars 1976. Ce garçon, âgé de 20 ans, est suivi dans le service du Pr BERTOYE depuis 1973. Depuis quelques mois, l'état du patient s'est aggravé.

Les premiers troubles sont apparus à 4 ans par l'atteinte des membres inférieurs. La marche est anormale du type "marche en canard".

A 8 ans, une cyphose nécessite la pose d'un corset jusqu'à l'âge de 12 ans. Pendant ces années, l'atteinte musculaire progresse au niveau des muscles du cou et de la ceinture scapulaire. Une dyspnée à l'effort apparaît.

En 1970, les diagnostics de pseudomyopathie de KUGELBERG-WELANDER et de myopathie de DUCHENNE sont avancés.

En février 1973, à la suite d'une grippe, le sujet est hospitalisé à

l'hôpital CARDIOLOGIQUE, dans un tableau d'insuffisance respiratoire aigue. Jean-Michel est ventilé et intubé pendant 10 jours. Depuis ce séjour à l'hôpital, il se ventile avec un "Bennett" pendant deux heures et demi par jour.

Actuellement, à l'âge de 22 ans, l'aggravation de l'état du patient porte sur le *plan respiratoire* ce qui nécessite son maintien dans le service des insuffisants respiratoires à l'Hôpital de la CROIX-ROUSSE.

A l'*examen clinique*, on note une *hépatomégalie*. L'examen musculaire montre une atteinte scapulaire et des muscles du cou. La *ceinture pelvienne* et les cuisses sont également touchées et produisent une amyotrophie importante.

Les réflexes idiomusculaires sont abolis. La cyphoscoliose est importante, elle entraîne une déformation du thorax qui reste souple.

L'*électromyogramme* est de type myogène sans myotonie électrique.

Le patient a deux frères en bonne santé et deux soeurs dont l'une, mariée, est en bonne santé.

La seconde soeur, Marie-Claude constitue le *cas n° 7*. Les renseignements que nous possédons sur cette jeune fille âgée aujourd'hui de 27 ans sont très incomplets car elle refuse l'hospitalisation. Elle semble présenter les mêmes signes cliniques que son frère, mais l'atteinte respiratoire ne nécessite pas la même surveillance.

I.1.2. Les tissus et milieux biologiques

I.1.2.1. Les placentas

Le tissu placentaire nous a permis de purifier l' α -1,4-glucosidase acide humaine. Les placentas nous ont été fournis gracieusement par Monsieur le Docteur LIAUTAUD (Institut Mérieux, Marcy l'Etoile-69); ils n'ont subi aucun traitement particulier. Ils sont conservés congelés à -20°C.

Les placentas utilisés proviennent de sujets apparemment sains.

I.1.2.2. les fragments hépatiques

— prélèvement :

. Les fragments hépatiques du patient n° 1 ont été prélevés à l'autopsie

. Pour le patient n° 2, le prélèvement hépatique a été effectué par voie chirurgicale.

. les prélèvements de foie *témoins* proviennent essentiellement de pièces d'autopsie de sujets indemnes d'affections touchant le métabolisme des hydrates de carbone. Plusieurs activités enzymatiques (activités de la glucose-6-phosphatase, de la phosphorylase, de l'amylo-1,6-glucosidase) sont dosées en même temps que celle de la maltase acide pour s'assurer de la bonne conservation de l'échantillon.

Tous les prélèvements sont conservés dans l'azote liquide ou au congélateur à -80°C jusqu'au moment de l'analyse.

— préparation des homogénats :

Les fragments hépatiques des témoins et des malades sont pesés à la balance de précision, puis broyés et homogénéisés soigneusement au mortier dans de l'eau bidistillée refroidie (en général homogénat au 1/10 P/V). L'homogénat ainsi préparé est utilisé immédiatement ou amené à une plus grande dilution suivant le cas.

I.1.2.3. Les fragments musculaires

Les fragments musculaires des sept patients ont été prélevés par voie chirurgicale sauf pour le patient n° 1 (prélèvement autopsique).

La préparation des homogénats *musculaires* est identique à celle utilisée pour le foie : homogénat au 1/10e ou 1/100e dans l'eau bidistillée refroidie.

I.1.2.4. Le fragment cardiaque

Un prélèvement de *tissu cardiaque* a été pratiqué à l'autopsie du patient n° 1. L'échantillon a été traité comme les prélèvements de foie et de muscle.

I.1.2.5. Les leucocytes

Les *leucocytes* sont isolés à partir de 10 cm³ de sang veineux hépariné selon le procédé classique à la *polyvinylpyrrolidone* : un volume d'une solution de *polyvinylpyrrolidone* citratée est ajouté à quatre volumes de sang total. La sédimentation est réalisée à 37°C. La couche supérieure de plasma renfermant les leucocytes, les plaquettes et quelques globules rouges est recueillie et centrifugée à froid à faible vitesse (600 g). Les globules rouges restant dans le culot de centrifugation sont lysés par choc hypotonique (addition d'eau bidistillée froide). Après rétablissement de l'isotonicité par addition de chlorure de sodium, le mélange est centrifugé à nouveau. L'opération est renouvelée jusqu'à l'obtention d'un sédiment exempt de globules rouges. Enfin, le culot leucocytaire est remis en suspension dans 0,5 ml de fluorure de sodium 0,05 M ou dans du chlorure de sodium isotonique.

La population cellulaire ainsi isolée est constituée d'un mélange de *polynucléaires*, de *lymphocytes* et de *plaquettes*.

Si le dosage est différé, la suspension est congelée à -80°C. Avant d'effectuer la détermination de l'activité enzymatique, la suspension leucocytaire est lysée aux ultrasons (trois fois 10 secondes à 8 Kc). Le lysat est centrifugé pour éliminer les débris cellulaires.

I.1.2.6. Les fibroblastes

Les *fibroblastes* sont obtenus à partir de biopsies cutanées pratiquées chez les patients 2, 3, 4, 6 et chez les parents des patients 2 et 3.

Le fragment prélevé de façon stérile à la face interne du bras, à l'aide d'une pince courbe, est mis en culture immédiatement ou après transport dans du sérum physiologique stérile à température ordinaire. Il est divisé en plus petits fragments avant d'être mis en culture en boîtes de Pétri.

Le milieu de culture est un milieu classique (HAM F 10) enrichi en sérum de veau foetal à 15% et supplémenté en antibiotiques. Les cellules sont placées à 37°C, en atmosphère humide à 100 % et sous 5 % de CO₂. Les études enzymatiques sont pratiquées à partir du quatrième repiquage. La récolte des

cellules est effectuée après trypsination. Les cellules sont lavées trois fois au sérum physiologique et remises en suspension avant lyse.

I.1.2.7. Les urines

Les urines des patients n° 2, 6 et 7 ont été analysées ; les échantillons correspondant à une miction ont été rapidement adressés au laboratoire où ils ont été congelés à -20°C jusqu'à leur étude.

I.1.3. Appareillage

Pour la purification et l'étude des propriétés de l'enzyme placentaire humaine, nous avons utilisé l'appareillage suivant :

- homogénéiseur ILA CX d'une puissance de 260 W, vitesse maximale 25.000 à 300.000 tours/minute
- ultracentrifugeuse superspeed 65 MSE équipée du rotor 6 X 250 ml ref. 59597.
- armoire à froid LKB 5201 Combi Cold Rac
- pompes péristaltiques LKB 12.000 Varioperpex
- colonne de verre 100 cm x 2,5 cm
- Uvicord II LKB 8300
- collecteur de fractions LKB
- enregistreur LKB 6500
- appareil à ultrafiltration Amicon de 50 ml, équipé d'une membrane Diaflo XM-50
- filtres Millipore 0,22 μ
- appareil à électrofocalisation LKB 2117 Multiphor
- spectrofluorimètre Aminco-Bowman
- spectrophotomètre Gilford 300 N
- homogénéiseur à ultrasons MSE

I.2. METHODES

I.2.1. Etudes en microscopie optique et électronique

Les études microscopiques ont été réalisées par le Dr GILLY (patient n° 1), le Dr LEUNG (patients n° 2 et 3) et le Dr CARRIER (patients n°4,5,6 et 7).

Les techniques utilisées ont déjà été décrites (18) (38).

I.2.2. Analyse biochimique

I.2.2.1. Réactifs

Les différents réactifs que nous avons employés sont précisés ci-dessous :

- réactif de Folin-Ciocalteu Merck
- anthrone Merck
- maltose et turanose (Pfanstiehl), 4-méthylumbelliféryl- α -D-glucopyranoside (Koch Light), glucose-oxydase (Worthington), peroxydase reinheitsgrad II 15302 (Boehringer)
- Séphadex G-100 (taille des grains 40-120 μ) (Pharmacia Fine Chemicals)
- adjuvant complet de Freund (Difco)
- agarose : Indubiose A37 (Industrie Biologique Française)
- ampholine pH 2,5-4 (LKB 1809-106), ampholine pH 4,0-6 (LKB 1809-116), ampholine pH 5,0-7 (LKB 1809-121)

I.2.2.2. Méthodes

I.2.2.2.1. dosage des protéines :

Nous avons utilisé la technique de LOWRY et coll. (156) modifiée par EGGSTEIN et KREUZ (70) avec de l'albumine humaine comme étalon. Cette technique permet le dosage des protéines dans une gamme allant de 0,1 à 0,5mg/ml.

I.2.2.2.2. dosage du glycogène :

Le dosage est pratiqué selon la technique colorimétrique à l'anthrone de SEIFTER et coll. (211). Le matériel utilisé doit être parfaitement propre. Dans un tube à essai, à 50 μ l d'un homogénat de foie au centième ou 200 μ l d'un homogénat de muscle au centième, on ajoute 200 μ l d'une solution de potasse à 20 %. Après avoir placé les tubes 30 minutes au bain-marie bouillant, on ajuste le volume à 1 ml par addition d'eau bidistillée. Parallèlement, un blanc est effectué sur 1 ml d'eau bidistillée et des étalons à 50 et 100 μ g de glycogène sont préparés.

Les tubes sont refroidis dans la glace. 2 ml d'acide sulfurique concentré et 3 ml de réactif à l'anthrone (réactif renfermant 120 mg d'anthrone pour 90 ml d'une solution sulfurique) sont ajoutés.

Les tubes sont placés dix minutes au bain-marie bouillant. Après refroidissement, ils sont photométrés à 620 nm contre le blanc réactif.

I.2.2.2.3. détermination de l'activité de l' α -1,4-glucosidase acide :

L'activité hydrolytique de la maltase acide a été testée sur deux substrats :

— technique au maltose (103)

L'activité de la maltase acide est mesurée à pH 4 en dosant le glucose libéré à partir du maltose sous l'action de l'enzyme. Le milieu réactionnel renferme 25 μ moles de tampon acétate pH 4, 0,75 μ mole de maltose et l'homogénat de foie au 1/100e ou de muscle au 1/10e dans un volume final de 0,2 ml. Après deux heures d'incubation à 37°C, la réaction est stoppée en plaçant les tubes pendant deux minutes au bain-marie bouillant.

On dose le glucose libéré par addition au milieu réactionnel de 2,5ml de réactif à la glucose-oxydase préparé selon la technique de HUGGETT et NIXON (116), mais dans lequel le tampon phosphate est remplacé par du tampon Tris-HCl (le Tris inhibe l' α -glucosidase éventuellement présente dans la glucose-oxydase commerciale). Un étalon à 20 μ g de glucose est dosé parallèlement. Un témoin maltose est également effectué car les préparations commerciales renferment toujours de faibles quantités de glucose ; sa valeur est déduite de celle des tubes réactions. Après incubation pendant une heure à 37°C, l'absorbance est lue à 420 nm sur un spectrophotomètre Gilford 300 N contre un blanc réactif.

L'activité est exprimée en unités par gramme de tissu humide (ou de protéines) c'est-à-dire en μ moles de maltose hydrolysées par minute et par gramme de tissu (ou de protéines).

L'activité maltasique leucocytaire est dosée selon une technique voisine dans laquelle la concentration en maltose est de 20 mM (26).

— technique au 4-méthylumbelliféryl- α -D-glucopyranoside (65)

A pH 4, l' α -1,4-glucosidase acide hydrolyse le MU-glucoside en libérant de la 4-méthylumbelliférone fluorescente à un pH supérieur à 10. Le milieu réactionnel renferme 25 μ l de tampon acétate 0,2 M, 25 μ l de MU-glucoside 1 mM et l'échantillon dans un volume final de 0,1 ml.

L'incubation est de 1 heure à 37°C. La réaction est stoppée par addition de 1,4 ml de tampon bicarbonate pH 10,5.

La fluorescence est lue sur un spectrofluorimètre Aminco Bowman (longueur d'onde d'excitation : 362 nm et longueur d'onde d'émission : 448 nm). Une solution de 4-méthylumbelliférone (Eastman) est utilisée comme étalon.

I.2.2.2.4. détermination de l'activité de l' α -1,4-glucosidase neutre :

Les méthodes précédemment décrites pour la maltase acide sont employées en substituant au tampon acétate un tampon phosphate pH 6,5 de même molarité.

I.2.2.2.5. détermination de l'activité des hydrolases acides lysosomiales :

Les activités de la β -D-glucosidase, β -D-galactosidase, α -D-mannosidase, α -L-fucosidase, l'hexosaminidase, la β -D-glucuronidase, l'arylsulfatase A et B, ont été évaluées selon des techniques décrites précédemment (159).

I.2.3. Analyses électrophorétique, immunoélectrophorétique et focalisation électrique

Les *analyses électrophorétiques* de l' α -1,4-glucosidase acide ont été pratiquées sur un support d'*acétate de cellulose* de la manière suivante :

Les bandes d'acétate de cellulose (17 cm x 2,5 cm) sont placées quinze à trente minutes dans un tampon phosphate de sodium 0,05 M pH 5,5, puis disposées sur un bac à électrophorèse rempli du même tampon refroidi.

5 μ l d'enzyme placentaire purifiée, 15 à 20 μ l d'extraits de fibroblastes ou de leucocytes ou 5 à 10 μ l d'extrait de foie sont déposés sur les bandes.

Après deux heures de migration à +4°C (courant de 2 mA par bande), l'activité enzymatique est révélée selon une technique "sandwich". La bande d'acétate de cellulose est placée pendant une heure à 37°C entre deux bandes de papier Whatman n° 1 imprégnées d'une solution 0,005 M de MU-glucoside tamponnée à pH 4 (ou à pH 6,5 pour l'étude de la maltase neutre). Les bandes sont révélées à l'aide de vapeurs d'ammoniaque : la présence d'une activité α -1,4-glucosidasique se traduit par une ou plusieurs bandes fluorescentes après examen sous lampe U.V (254 nm).

La maltase acide placentaire purifiée a été soumise à une *analyse immunoélectrophorétique* en gélose à 1,5 %. La durée de migration est de une heure à 100 V (100 mA). L'antisérum de lapin antimaltase acide est déposé dans les gouttières. Après 48 heures de migration, la plaque est lavée, séchée et colorée à l'azocarmin. La décoloration est réalisée par une solution d'acide acétique à 5 %.

La *focalisation électrique* est effectuée dans la gamme de pH 2,5-6. Le gel de polyacrylamide a été préparé selon les instructions du fabricant :

solution d'acrylamide à 29,1 % (p/v) :	10 ml
solution de NN'-méthylène bisacrylamide (Bis) à 0,9 % (p/v) :	10 ml
solution de sucrose à 7,5 g % :	36,6 ml
ampholine pH 2,5-4 :	1,2 ml
ampholine pH 4,0-6 :	1,2 ml
ampholine pH 5,0-7 :	0,6 ml

Après agitation et dégazage du mélange, 0,4 ml d'une solution de riboflavine à 0,004 % (p/v) sont ajoutés.

Le temps nécessaire à la polymérisation du gel est d'une heure sous lumière fluorescente. Ainsi, nous obtenons un gel dont les dimensions sont

environ de 25 cm x 12 cm x 0,2 cm.

Le dépôt de l'échantillon (5 μ l d'enzyme placentaire purifiée, 10 à 20 μ l d'extrait de foie, 20 μ l d'extraits de leucocytes ou de fibroblastes) se fait sur de petits morceaux de papier Whatman pour chromatographie de 5 x 10 mm.

Le voltage de départ est de 400 V (courant 50 mA) ; à la fin de la manipulation le voltage est de 800 V (courant 17 mA). A la cathode, on utilise une solution d'ampholine pH 5-7 à 0,5 % et à l'anode, une solution d'acide phosphorique 1 M. La durée de la migration est de 90 minutes. Le pH en différents points du gel est mesuré à l'aide d'une électrode de contact Desaga.

Pour la révélation de l'activité maltasique acide, un gel d'agar noble à 1 % tamponné à pH 4 et renfermant le substrat MU-glucoside 0,5 mM est coulé sur le gel d'ampholine. Après une heure d'incubation à 37°C, la révélation est effectuée en présence de vapeurs d'ammoniaque et la fluorescence est immédiatement observée sous lampe U.V.

L'activité maltasique neutre peut être révélée de la même manière en utilisant un gel d'agar tamponné à pH 6,5.

I.2.4. Technique de purification de l' α -1,4-glucosidase acide placentaire humaine

Nous avons utilisé la méthode décrite en 1972 par de BARSY et coll. (54). Cependant, les placentas bruts qui constituent notre source enzymatique sont différents de ceux employés par ces auteurs ; les placentas utilisés par de BARSY ont été, en effet, traités à l'alcool pour en extraire les immunoglobulines et l'albumine.

I.2.4.1. *Lavage des placentas*

Le placenta, tissu richement vascularisé, renferme une très grande quantité de sang qu'il est nécessaire d'éliminer avant d'entreprendre la purification. 400 grammes de placenta congelé sont placés dans une solution de chlorure de sodium isotonique préalablement refroidie. Après décongélation à température ordinaire, le tissu est découpé en gros dés. La solution isotonique est

renouvelée régulièrement, les solutions de lavage étant éliminées. La préparation est laissée une nuit à +4°C. Le lendemain, les morceaux de placenta sont filtrés sur gaze et rincés abondamment avec la solution de chlorure de sodium isotonique, jusqu'à ce que les eaux de lavage soient incolores.

I.2.4.2. Homogénéisation du tissu

Les résidus placentaires sont additionnés de 1500 ml d'eau bidistillée. L'homogénéisation est réalisée à l'aide de l'appareil ILA CX. La suspension est filtrée sur gaze.

I.2.4.3. Précipitation des protéines à l'acide chlorhydrique N

Le pH du filtrat est abaissé d'un pH voisin de 7 à pH 3,8 par addition lente d'acide chlorhydrique N sous agitation constante. Le précipité de protéines est éliminé par centrifugation à +4°C à 5000 tours/minute.

I.2.4.4. Précipitation au sulfate d'ammonium

Le surnageant de centrifugation est traité au sulfate d'ammonium (addition lente et sous agitation constante de 500 g de sulfate d'ammonium à chaque litre de surnageant). La solution est laissée une nuit à +4°C. Le lendemain, le précipité recueilli par centrifugation à 27.000 g, est remis en suspension dans 40 ml d'une solution 25 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 5, ajoutés par petites fractions. La préparation est placée dans un sac de collodion et mise à dialyser une nuit à +4°C contre la solution 25 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 5. L'élimination du sulfate d'ammonium est contrôlée par la réaction des ions sulfate avec le chlorure de baryum. Lorsque la réaction du liquide de dialyse avec le chlorure de baryum est négative, le contenu du sac de collodion est centrifugé à +4°C ; le surnageant de centrifugation est concentré sur une cellule Amicon équipée d'une membrane XM-50 de manière à obtenir un volume de 10 à 15 ml.

I.2.4.5. Application de l'échantillon sur la colonne de Séphadex G-100

Cette opération est l'étape-clef de la purification ; elle est effectuée selon la technique décrite par BRUNI et coll. (31). Le gonflement du gel de Séphadex G-100 medium est réalisé, soit au bain-marie bouillant pendant

cinq à six heures, soit à la température ordinaire pendant 48 à 72 heures. Le gel est dégazé avant le remplissage de la colonne. L'équilibration de la colonne (100 cm x 2,5 cm) et son élution se font à l'aide de la solution 25 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 5. L'échantillon concentré à l'étape précédente est appliqué au sommet de la colonne. L'élution des protéines est contrôlée à l'aide de l'Uvicord II et des fractions de 10 ml sont recueillies à l'aide du collecteur de fractions. Le débit d'élution est de 10 ml/heure. L'ensemble de l'appareillage (figure n° 6) est placé dans une armoire à froid. Les fractions présentant une absorbance négligeable à 280 nm et actives du point de vue enzymatique sont concentrées sur une cellule Amicon équipée d'une membrane Diaflo XM-50.

I.2.5. Préparation d'anticorps anti- α -1,4-glucosidase acide humaine

I.2.5.1. Immunisation de l'animal

Des anticorps spécifiques antimaltase acide placentaire ont été obtenus après injection à deux lapins d'une solution d'enzyme purifiée renfermant 100 μ g de protéines par millilitre. Le protocole d'immunisation adopté est résumé sur la figure n° 7 . Dix jours après la cinquième injection, une petite saignée est pratiquée à la veine marginale de l'oreille pour doser les anticorps synthétisés. L'immunisation étant satisfaisante, nous saignons à blanc le lapin dix jours après une sixième injection d'enzyme purifiée. Les lapins anesthésiés au penthiobarbital sont sacrifiés par ponction intracardiaque. Le sang est recueilli dans des tubes à centrifuger de 100 ml. Les tubes sont laissés une demi-journée à la température du laboratoire et une nuit à +4°C pour laisser exsuder le sérum. Le lendemain matin, les tubes sont centrifugés à +4°C. Le sérum recueilli est filtré sur millipore 0,22 μ , puis congelé à -80°C en petites fractions de 1 ml environ.

I.2.5.2. Dosage des anticorps anti- α -1,4-glucosidase acide humaine

Le dosage des anticorps est pratiqué selon une technique de double diffusion en gélose de type OUCHTERLONY (182). Nous utilisons un gel d'agarose à 1,25 % en tampon véronal pH 8,6. Le gel est coulé sur des lames porte-objet, puis laissé une vingtaine de minutes à la température du laboratoire avant d'être placé une heure à +4°C en chambre humide. Nous creusons alors des petits puits à l'emporte-pièce dans la gélose (figure n° 8). La distance entre

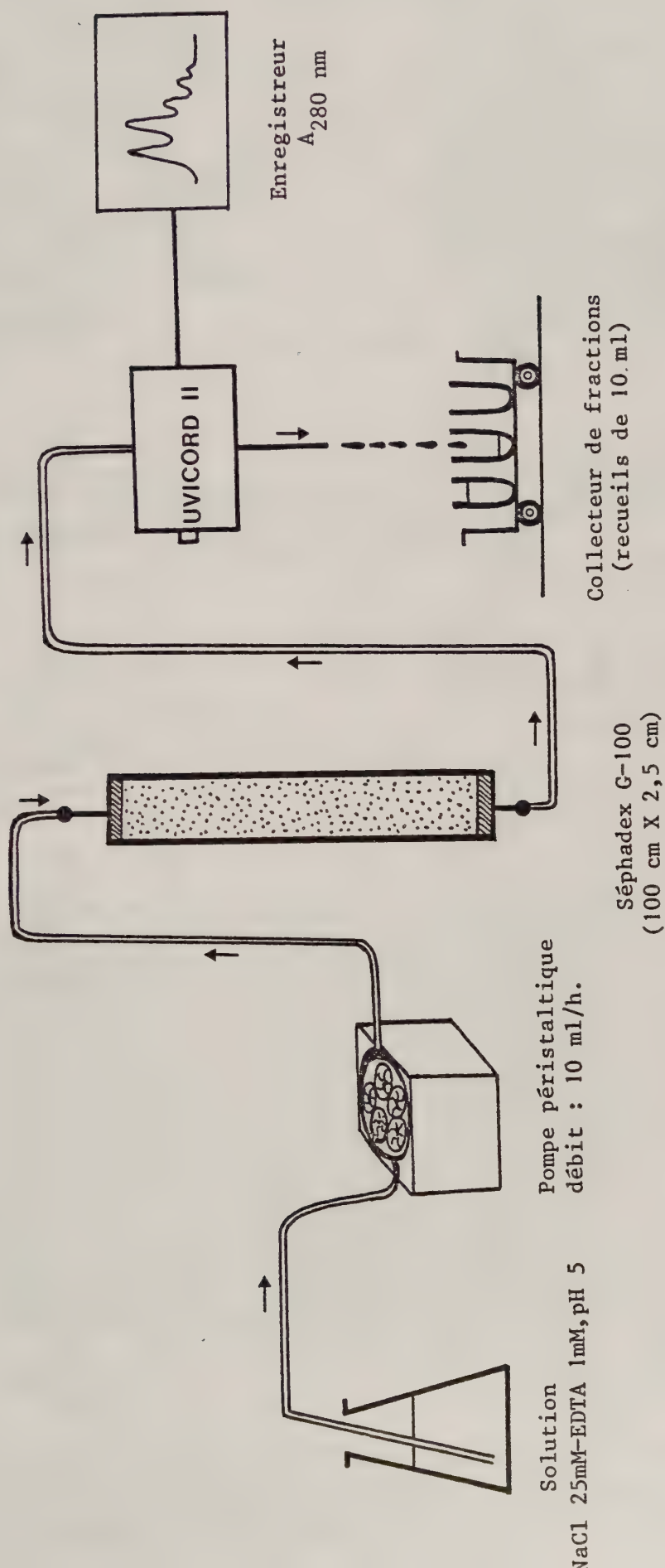


Fig. 6. Schéma de l'appareillage utilisé pour la purification
de l'alpha-1, 4-glucosidase acide placentaire.

Fig. 7. PROTOCOLE D'IMMUNISATION

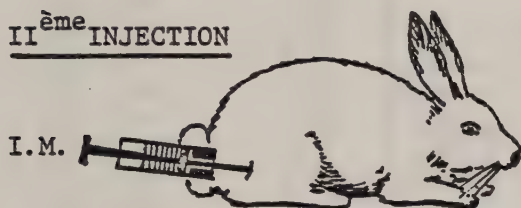
I^{ère} INJECTION : Emulsion de 5 ml d'enzyme purifiée (100 µg/ml) avec 5 ml d'adjuvant complet de Freund.

LAPIN 8740



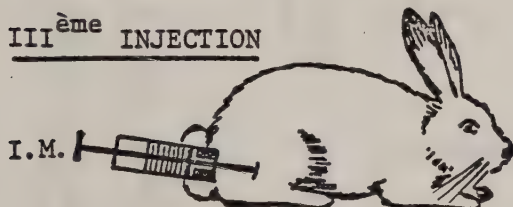
1 ml d'émulsion dans les 4 pattes.

II^{ème} INJECTION



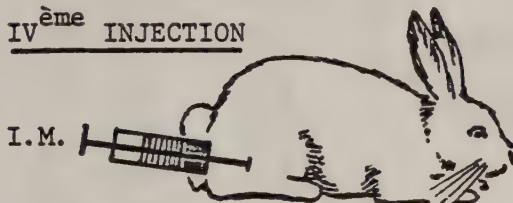
0,5 ml d'enzyme purifiée.

III^{ème} INJECTION



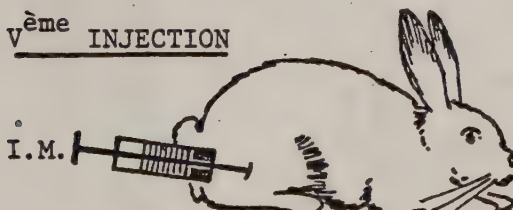
0,5 ml d'enzyme purifiée.

IV^{ème} INJECTION



0,5 ml d'enzyme purifiée.

V^{ème} INJECTION



0,5 ml d'enzyme purifiée.



DELAI 10 JOURS

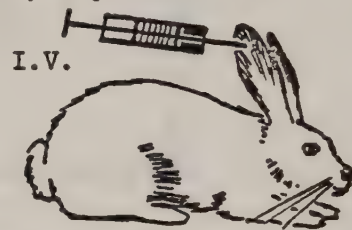
LAPIN 8721



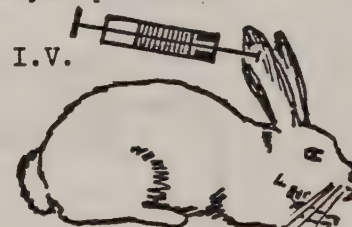
1 ml d'émulsion I.M., 1,5 ml I.P.



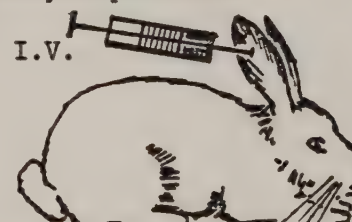
1 ml d'enzyme purifiée.



1 ml d'enzyme purifiée.



1 ml d'enzyme purifiée.



1 ml d'enzyme purifiée.



RECUEIL DU SANG DES DEUX LAPINS PAR PONCTION INTRA-CARDIAQUE

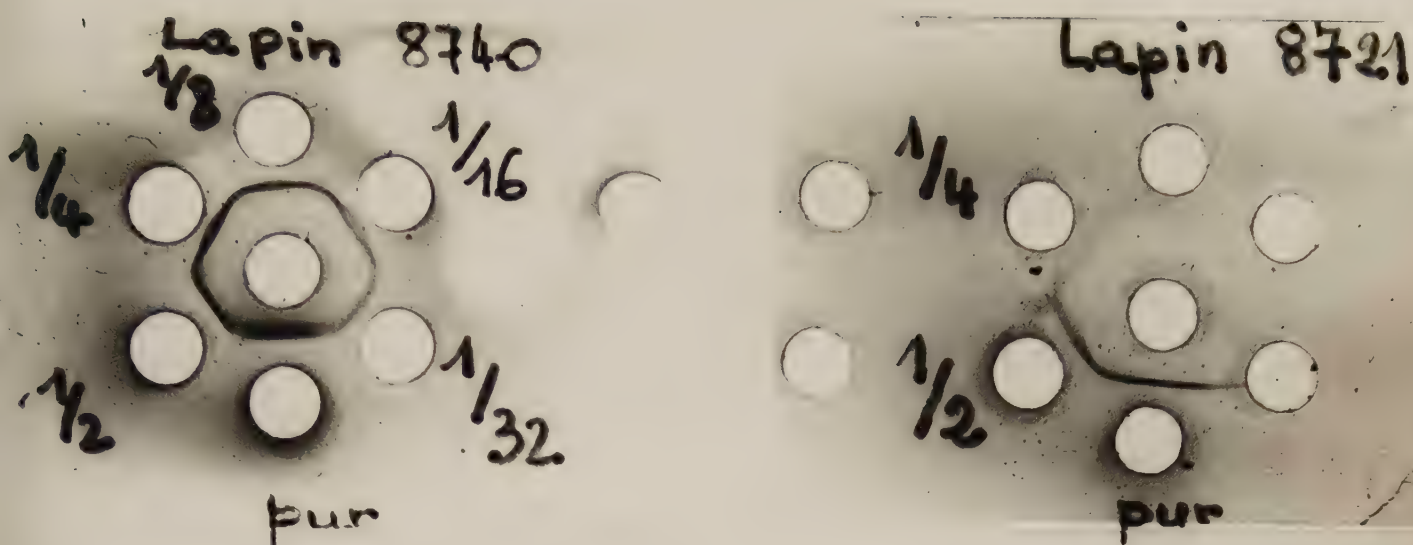


fig 8 - dosage des anticorps anti alpha-1, 4- glucosidase selon la méthode d'OUCHTERLONY.

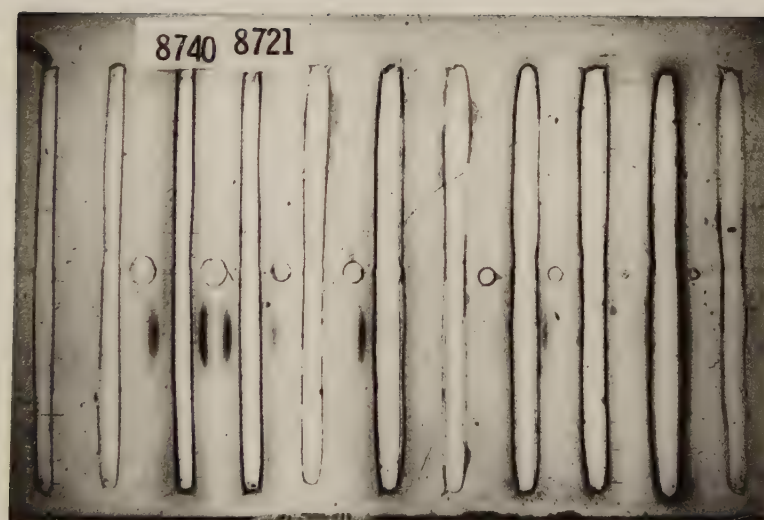


fig 10 - étude immunoélectrophorétique de la préparation d'alpha-1, 4- glucosidase acide purifiée.

le puits central et les autres puits doit être inférieure au double du diamètre des puits. Le volume de ceux-ci est de 15 µl environ. Le puits central est destiné à recevoir l'antigène (c'est-à-dire l'enzyme purifiée) et les puits périphériques les différentes dilutions de l'antisérum. La lecture est effectuée après 12 à 24 heures de diffusion en chambre humide à +4°C. Une réaction antigène-anticorps est objectivée par l'apparition d'une ligne de précipitation entre deux puits. Le titre du sérum est donné par la dernière dilution du sérum qui produit encore un arc de précipitation visible.

Les lignes de précipitation en gélose apparaissent plus nettes après coloration selon le procédé suivant :

- . la gélose est lavée dans du chlorure de sodium à 9 %. pendant 48 heures, puis rincée à l'eau distillée et enfin séchée sous une lampe à infra-rouge.

- . la lame est alors trempée pendant deux minutes dans une solution d'Amidoschwarz à 1 g %. dans le mélange suivant :

- méthanol 450 ml
- acide acétique 100 ml
- eau distillée 450 ml

- . la décoloration dans le mélange méthanol - acide acétique - eau dure 24 heures.

Les lignes de précipitation apparaissent ainsi très nettement en bleu foncé sur fond bleu clair.

Le titre des anticorps peut être également déterminé par la propriété qu'ont les anticorps d'inhiber l'activité enzymatique d'une préparation d' α -1,4-glucosidase acide placentaire purifiée.

Pour réaliser ce titrage, 10 µl de dilutions successives de l'antisérum sont introduits dans le milieu réactionnel.

RESULTATS

II.1. PURIFICATION DE L' α -1,4-GLUCOSIDASE ACIDE PLACENTAIRE HUMAINE,
PROPRIETES DE L'ENZYME PURIFIEE ET PREPARATION D'ANTICORPS SPECIFIQUES :

II.1.1. Purification de l'enzyme placentaire :

II.1.1.1. Schéma de purification

Nous avons réalisé six manipulations différentes en vue de la purification de l'enzyme placentaire. Nous présentons les résultats d'une de ces purifications, les schémas de purification étant très comparables, nous n'avons pas jugé nécessaire de rapporter les six expériences.

Le profil d'élution obtenu après chromatographie sur Sephadex G-100 est schématisé sur la figure 9. Les protéines sont éliminées avec les 350 premiers millilitres d'éluat alors que l'activité maltasique acide est retrouvée entre les 450èmes et les 700èmes millilitres. Il est à noter qu'un petit pic d'activité enzymatique est élué en même temps que le pic de protéines. Pour une colonne de Sephadex donnée, l'activité enzymatique se retrouve dans les mêmes fractions d'une expérience à l'autre.

Le schéma de purification est rapporté dans le tableau X.

TABLEAU X - PURIFICATION DE L' α -1,4-GLUCOSIDASE ACIDE PLACENTAIRE
(sauf indication contraire, les activités enzymatiques
sont déterminées sur le MU-glucoside).

Etape	Volume (ml)	Activité Totale (U)	Protéines (mg/ml)	Activité Spécifique (U/g)	Purification	Rendement %
1-Homogénat	2000	8,8	2,2	2,0	1	100 %
2-Surnageant acification pH4	1850	7,23	1,7	2,3	1,15	82 %
3-Précipité (NH ₄) ₂ SO ₄ dialysé	65	5,83	7,8	11,5	5,75	66 %
4-Eluat Sephadex G-100 concentré (10X)	35	1,41	0,20	201 substrat maltose:3500	100,5	16 %

Purification de l'alpha-1,4-Glucosidase acide placentaire sur Sephadex G100

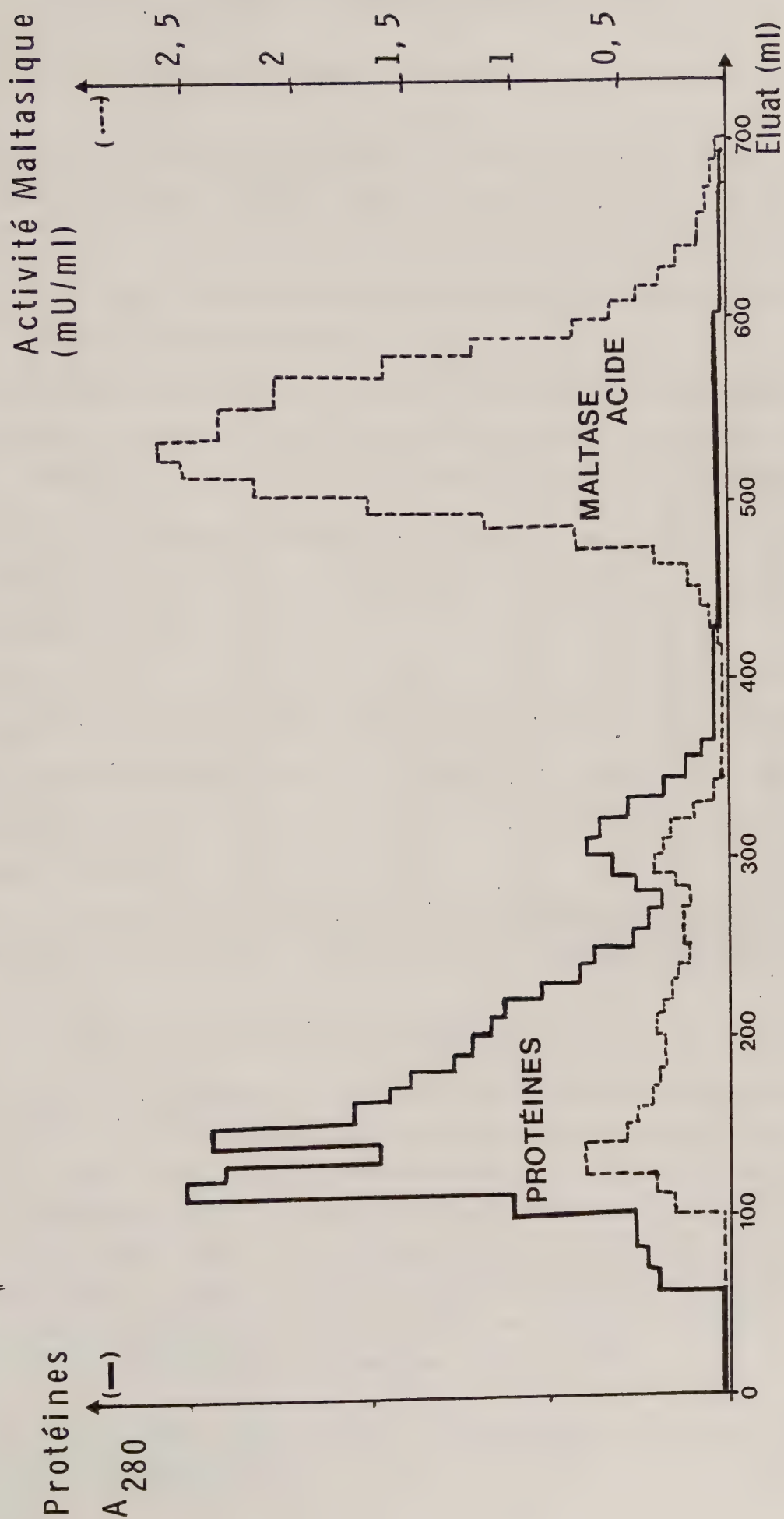


FIGURE 9

II.1.1.2. Critères de pureté de l'enzyme purifiée :

II.1.1.2.1. Critères biochimiques :

Nous avons recherché une éventuelle contamination de la préparation de maltase acide purifiée par d'autres enzymes lysosomiales (tableau XI). Seule la présence de *N-acétyl-β-D-glucosaminidase* peut être retenue comme contamination.

TABEAU XI - ETUDE DE LA CONTAMINATION PAR LES HYDROLASES LYSOSOMIALES DE LA MALTASE ACIDE PLACENTAIRE PURIFIEE

(Activités enzymatiques exprimées en unités par grammes de protéines).

Enzyme	Etape 1	Etape 3	Etape 4	Contamination (%)
β -Glucosidase	-	-	0	0 %
β -Galactosidase	-	-	0	0 %
α-Mannosidase	-	-	0	0 %
α -L-fucosidase	2,1	6,85	0,91	0,40%
N-acétyl-β -D-glucosaminidase	178	286	10,4	5,2%
β -Glucuronidase	-	-	-	0 %
Arylsulfatase A ou B	-	-	0	0 %

Activité contaminant

La contamination a été calculée à l'aide du rapport $\frac{\text{Activité enzyme purifiée}}{\text{Activité contaminant}} \times 100$

II.1.1.2.2. Critères électrophorétiques :

L'analyse électrophorétique sur *acétate de cellulose* de l'enzyme placentaire purifiée met en évidence une seule bande fluorescente intense après révélation à pH 4 avec le MU-glucoside comme substrat. A pH 6,5 la révélation de l'activité maltasique montre également la présence d'une seule bande fluorescente qui est située au même niveau que la précédente, mais qui possède une intensité beaucoup moins forte ; cette bande révélée à pH 6,5 disparaît si l'électrophorèse est effectuée en présence d'anticorps antimaltase acide ce qui prouve qu'elle est due à l'activité résiduelle de la maltase acide à ce pH.

Par *focalisation électrique*, nous n'avons observé qu'une seule bande de migration après révélation à pH 4.

II.1.1.2.3. Critères immunologiques :

Cette étude a été réalisée à l'aide des anticorps antimaltase acide obtenus chez le lapin (cf paragraphe II.1.3.).

Un seul arc de précipitation Enzyme-Anticorps est observé en gélose (technique d'OUCHTERLONY) (fig. 8). Cette observation est en faveur de l'homogénéité antigénique de la préparation enzymatique purifiée.

La présence d'une seule ligne de précipitation sur le tracé immunoélectrophorétique confirme la pureté de la préparation. (fig.10).

II.1.2. Propriétés de l'enzyme purifiée :

II.1.2.1. Point isoélectrique:

Le point isoélectrique de l' α -1,4-glucosidase acide placentaire purifiée est égal à 4,75 (fig. 11).

II.1.2.2. Constante de Michaelis-Menten (Km) :

La Km de l'enzyme purifiée a été déterminée vis-à-vis des substrats maltose (fig. 12) et MU-glucoside (fig. 13). La représentation adoptée est celle de LINEWEAVER-BURK.

La Km est de 12,5 mM pour le maltose et de 6,7 mM pour le MU-glucoside.

On ne constate pas d'inhibition par un excès de substrat, ni de phénomène d'allostérie bien que l'enzyme soit constituée de plusieurs sous-unités.

II.1.2.3. pH optimum :

L'influence du pH sur l'activité enzymatique a été étudiée vis-à-vis de l'hydrolyse du MU-glucoside. Un tampon citrate de sodium-acide citrique a été utilisé de pH 3 à 6,2 et un tampon phosphate monosodique-phosphate disodique de pH 5,7 à 8,5. Ces tampons utilisés à la concentration 0,1 M dans le milieu réactionnel remplacent le tampon acétate dans la technique de dosage de l' α -1,4-glucosidase décrite dans le chapitre "Matériel et Méthodes". Dans la zone commune aux deux systèmes tampon (5,7-6,2) le comportement de l'enzyme est identique quel que soit le tampon utilisé.

Détermination du point isoélectrique de l'enzyme placentaire purifiée

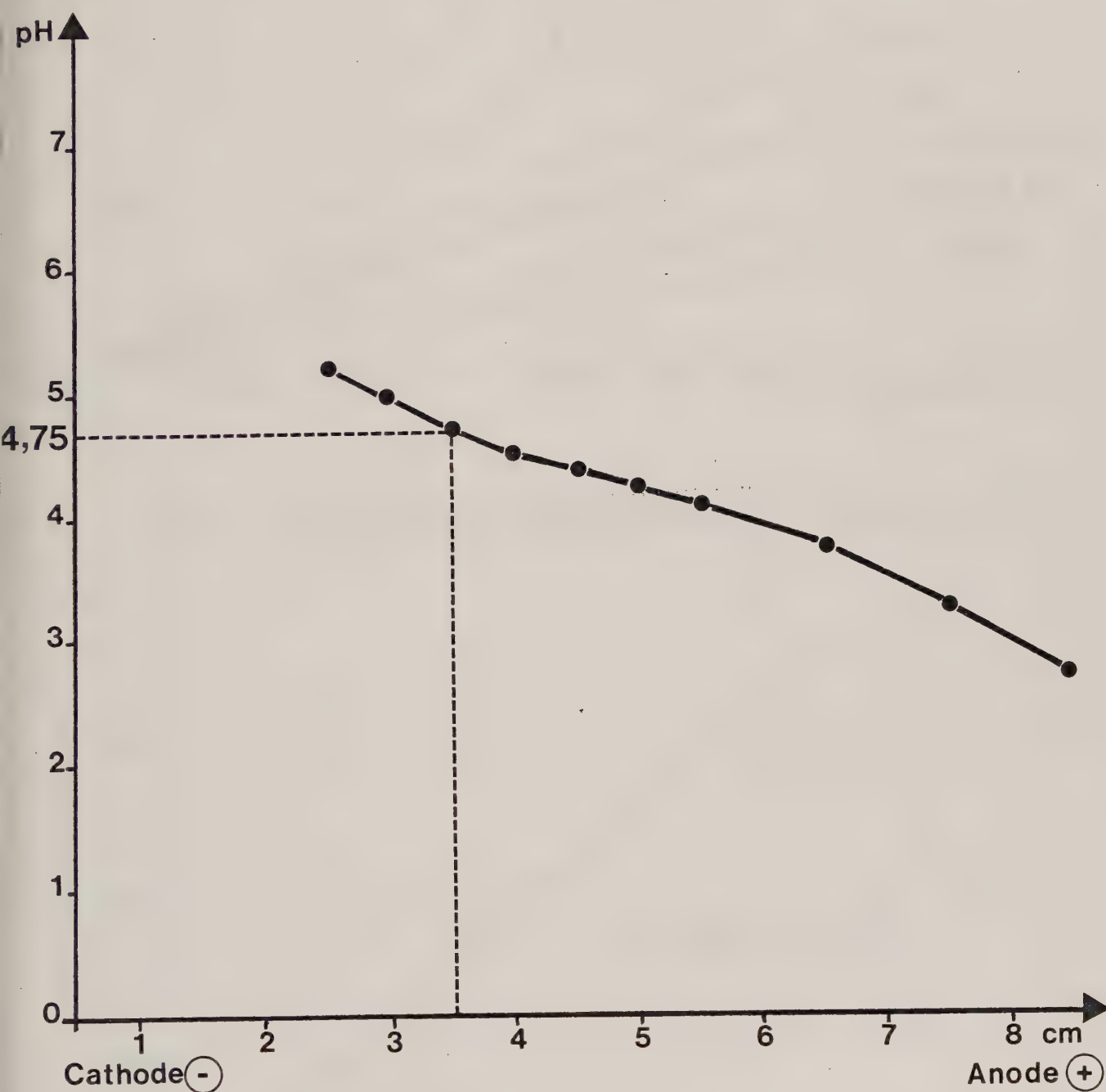


FIGURE 11

Fig. 12. K_m de l'enzyme purifiée (substrat : maltose).

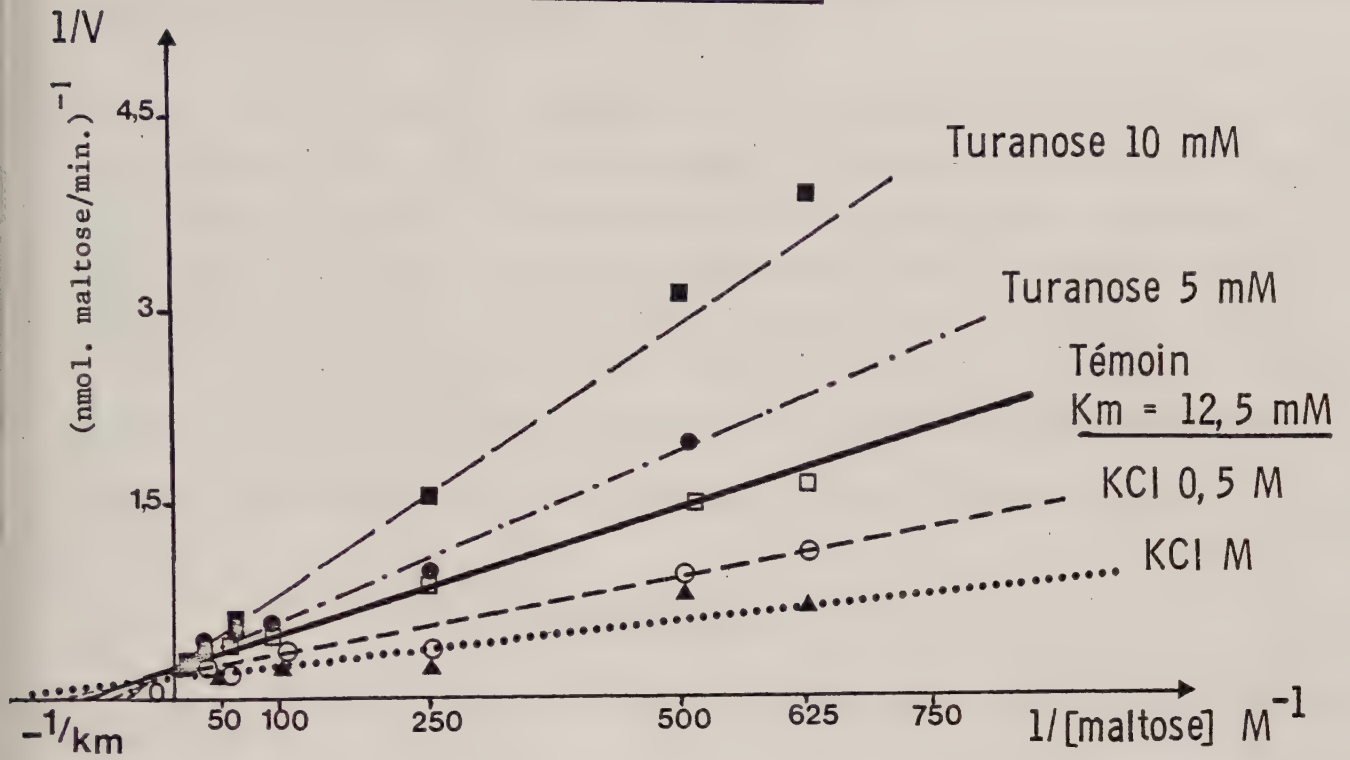
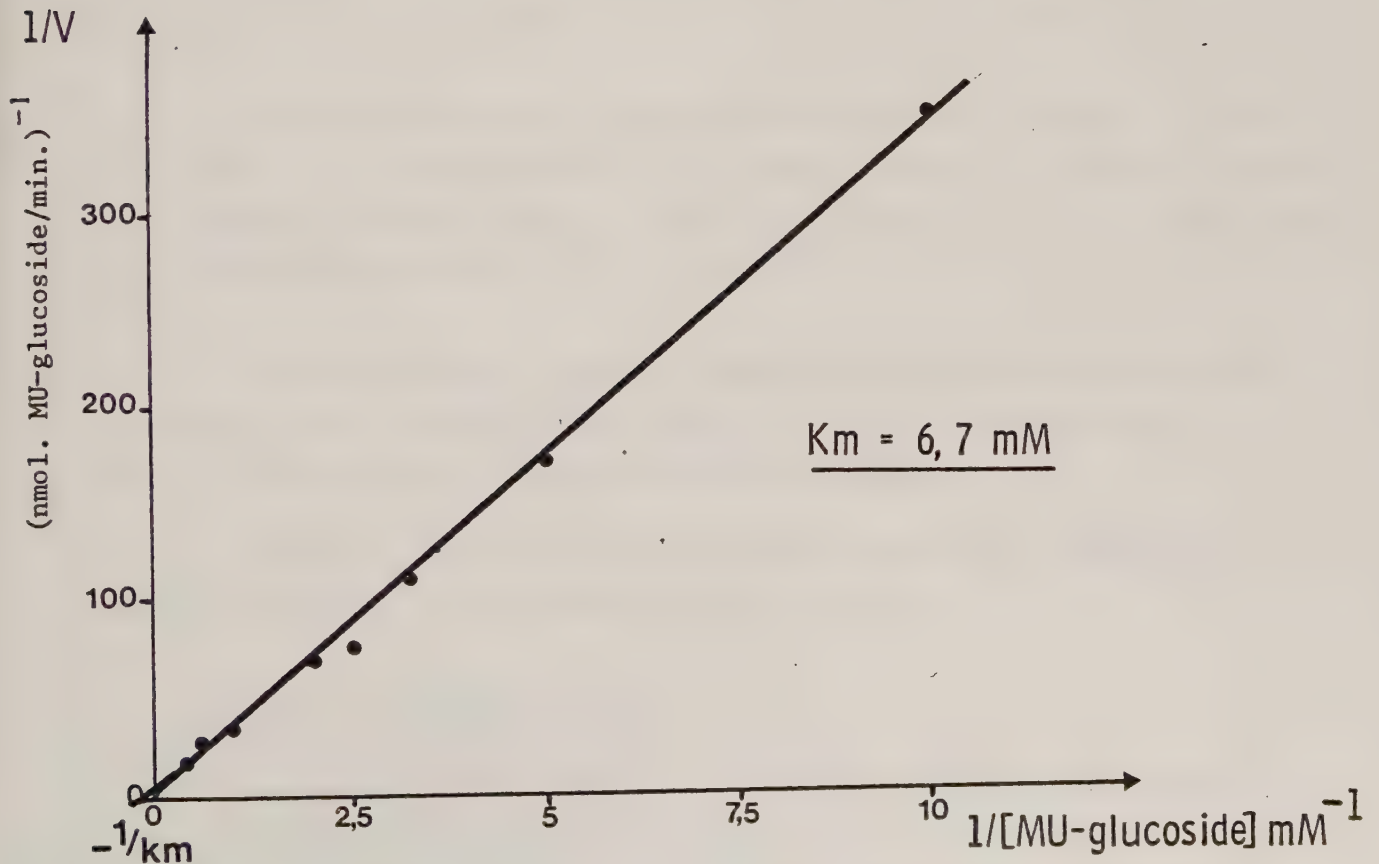


Fig. 13. K_m de l'enzyme purifiée (substrat : MU-glucoside).



La figure 14 montre l'influence du pH sur les activités de l'enzyme placentaire purifiée, de l'homogénat placentaire, de l'homogénat placentaire en présence de turanose 0,1 M et enfin de l'homogénat placentaire en présence d'anticorps antimaltase acide.

Les pH optima de l'enzyme purifiée et de l'homogénat placentaire sont très voisins : 4,8 et 4,75 respectivement. La courbe d'activité obtenue pour l'homogénat placentaire ne montre pas de pic net à pH neutre. Cependant, la présence d'une faible activité maltasique neutre dans l'homogénat (dont le pH optimum est de 6,5) a été démontrée après addition de turanose 0,1 M ou d'anticorps spécifiques antimaltase acide (Fig. 14). Pour l'enzyme purifiée, le rapport $\frac{\text{activité pH 4,8}}{\text{activité pH 6,5}}$ est de 4 environ ; l'activité maltasique mesurée à pH 6,5 est inhibée à près de 90 % par des anticorps anti-maltase acide.

II.1.2.4. Thermostabilité :

La *thermostabilité* de l'enzyme purifiée a été déterminée de la manière suivante :

Une préparation d'enzyme placentaire purifiée (1 MU/ml, substrat MU-glucoside) est préincubée pendant 15 minutes à pH 4 à différentes températures. L'activité maltasique acide de la préparation ainsi traitée est évaluée avec le MU-glucoside comme substrat selon la technique précédemment décrite.

Les résultats de cette étude sont présentés sur la figure 15. Entre 4°C et 50°C, l'activité catalytique de l'enzyme placentaire n'est pas diminuée et il apparaît même une légère activation de l'enzyme (l'activité enzymatique mesurée après préincubation à 50°C est égale à 110 % de l'activité témoin à + 4°C).

L'inactivation de l'enzyme n'apparaît qu'à une température de 55°C (l'activité à cette température est égale à 60 % de la valeur témoin). A 66°C, l'inactivation de l'enzyme est presque totale.

L'enzyme placentaire purifiée est donc thermostable jusqu'à 50°C et rapidement inactivée à une température plus élevée.

II.1.2.5. Influence des ions :

Nous avons étudié l'influence du chlorure de sodium, du chlorure de potassium, du dihydrogénophosphate de sodium et du dihydrogénophosphate de potassium sur l'activité maltasique acide d'un échantillon d'enzyme purifiée.

Fig. 14. Influence du pH sur l'activité de l' α -1, 4-glucosidase acide placentaire

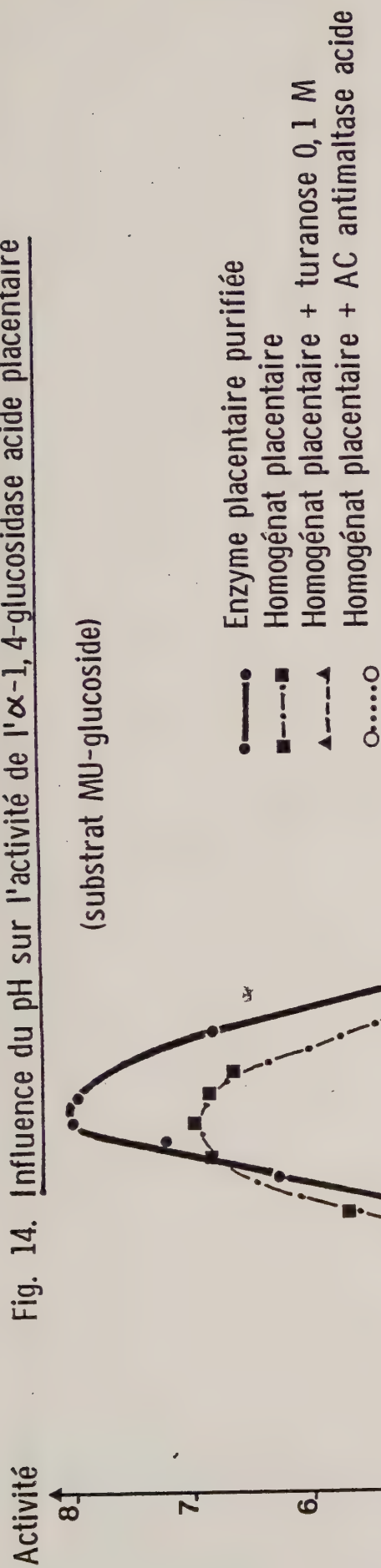
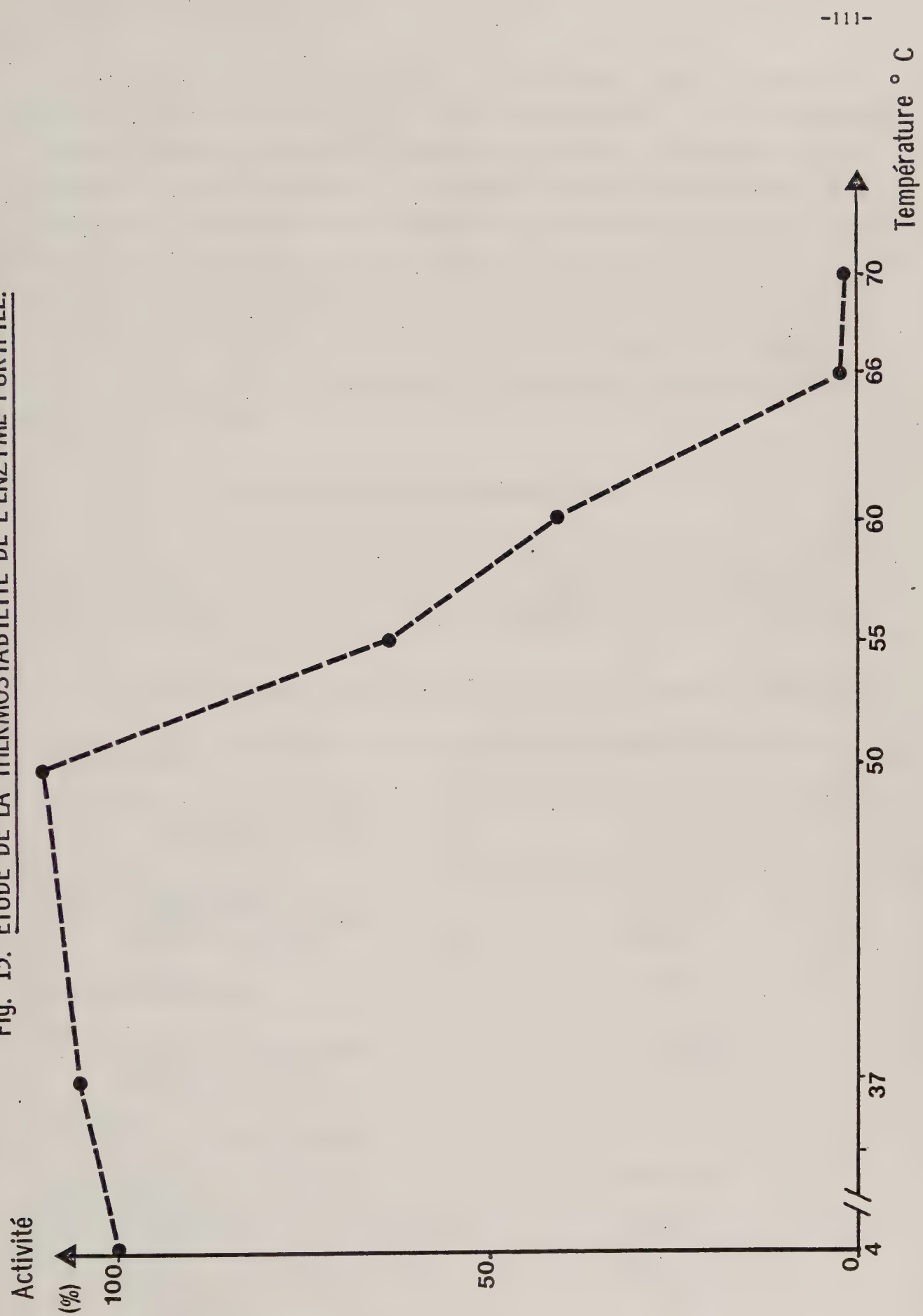


Fig. 15. ETUDE DE LA THERMOSTABILITE DE L'ENZYME PURIFIEE.



La figure 16 résume les résultats de cette étude. Dans nos conditions opératoires, le chlorure de sodium a peu d'influence sur l'activité maltasique, il semble néanmoins posséder un léger effet inhibiteur. L'activation par le phosphate diacide de sodium est à souligner, elle est très progressive en fonction de l'augmentation de la concentration en sel dans le milieu réactionnel, mais elle peut atteindre des taux comparables à ceux observés pour le chlorure de potassium ou de phosphate diacide de potassium (augmentation de 70 % de l'activité enzymatique pour une concentration en phosphate diacide de sodium égale à 0,2 M). L'activation par le chlorure de potassium ou le phosphate diacide de potassium est observée pour de très faibles concentrations en sel (de l'ordre de 2 mM).

II.1.2.6. Inhibition par le turanose 0,1 M

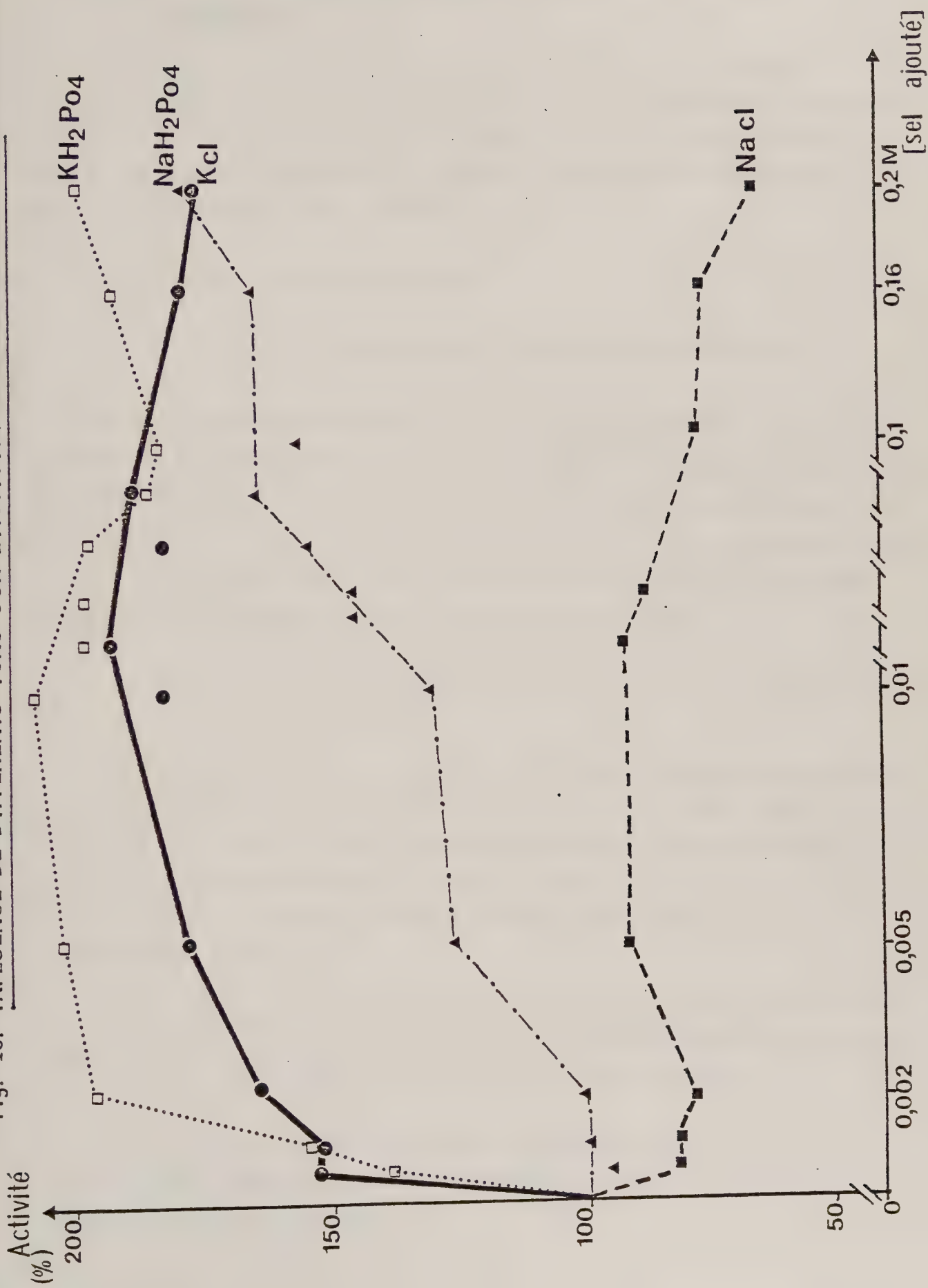
L'inhibition par le turanose 0,1 M de l'activité de l'enzyme placentaire purifiée (4 mU/ml) est de 96 % (substrat : MU-glucoside). Vis-à-vis du maltose, le turanose se comporte comme un inhibiteur compétitif (fig. 12).

Le tableau XII résume les propriétés de l'enzyme placentaire purifiée.

TABLEAU XII - PROPRIETES DE L' α -1,4-GLUCOSIDASE PLACENTAIRE PURIFIEE.

PROPRIETE ETUDIEE	RESULTAT
<u>Activité spécifique</u> :	
. substrat : MU-glucoside	201 U/g
. substrat : maltose	3500 U/g
<u>Point Isoélectrique</u> :	4,75
<u>Km</u> :	
. substrat : MU-glucoside	6,7 mM
. substrat : maltose	12,5 mM
<u>pH optimum</u> :	
. substrat : MU-glucoside	4,8
<u>Thermostabilité</u> :	jusqu'à 50° C
<u>Influence des ions</u> :	
. KCl	activation
. Na Cl	légère inhibition
. Na PO ₄ H ₂	activation
. K PO ₄ H ₂	activation
<u>Inhibiteur par le turanose</u> :	
. MU-glucoside	inhibition à 96 %
. maltose	inhibition compétitive

Fig. 16. INFLUENCE DE DIFFERENTS IONS SUR L'ACTIVITE DE L'ENZYME PURIFIEE.



II.1.3. Etude des anticorps spécifiques anti α -1,4-glucosidase acide placentaire :

L'injection de l'enzyme placentaire purifiée à deux lapins (lapins n° 8740 et 8721) nous a permis d'obtenir des anticorps spécifiques antimaltase acide. Nous avons recueilli 70 ml d'antisérum pour le lapin 8740 et 60 ml pour le lapin 8721. Nous décrirons rapidement les propriétés des anticorps anti- α -1,4-glucosidase acide placentaire.

II.1.3.1. Titre des anticorps :

II.1.3.1.1. *Titration selon la technique d'OUCHTERLONY :*

Les anticorps antimaltase acide sont des anticorps précipitants et ils peuvent donc être dosés selon la technique d'OUCHTERLONY. Le titre du sérum du lapin 8740 est de 52, alors que celui du sérum du lapin 8721 est de 2 (fig. 8). Les résultats semblent montrer que la voie intramusculaire (utilisée pour le lapin 8740) est une meilleure méthode d'immunisation que la voie intrapéritonéale et intraveineuse (lapin 8721). Mais, nous ne pouvons conclure définitivement puisque nous ne disposons pas d'un lot de lapins suffisant.

II.1.3.1.2. *Titration par inhibition de l'activité maltasique acide :*

Cette technique de titration utilisée sur le substrat MU-glucoside apparaît plus sensible que la précédente (fig. 17). En effet, pour une dilution au 1/32ème du sérum 8740 (dernière dilution donnant un arc de précipitation en gélose), l'activité enzymatique est encore inhibée à 50 % ; il faut atteindre une dilution de 1/512 pour retrouver l'activité enzymatique 100 %. Le titre du sérum 8721 est de 128.

Il est à remarquer que l'inhibition de l'hydrolyse du MU-glucoside n'est jamais complète et qu'il persiste toujours une activité enzymatique résiduelle de l'ordre de 5 à 10 % même en présence d'antisérums non dilués.

L'inhibition de l'activité de l' α -1,4-glucosidase par ses anticorps spécifiques est immédiate, elle n'est pas modifiée par une préincubation enzyme-anticorps de 15 minutes.

Fig. 17. TITRAGE DES ANTICORPS PAR INHIBITION
DE L'ACTIVITE MALTASIQUE

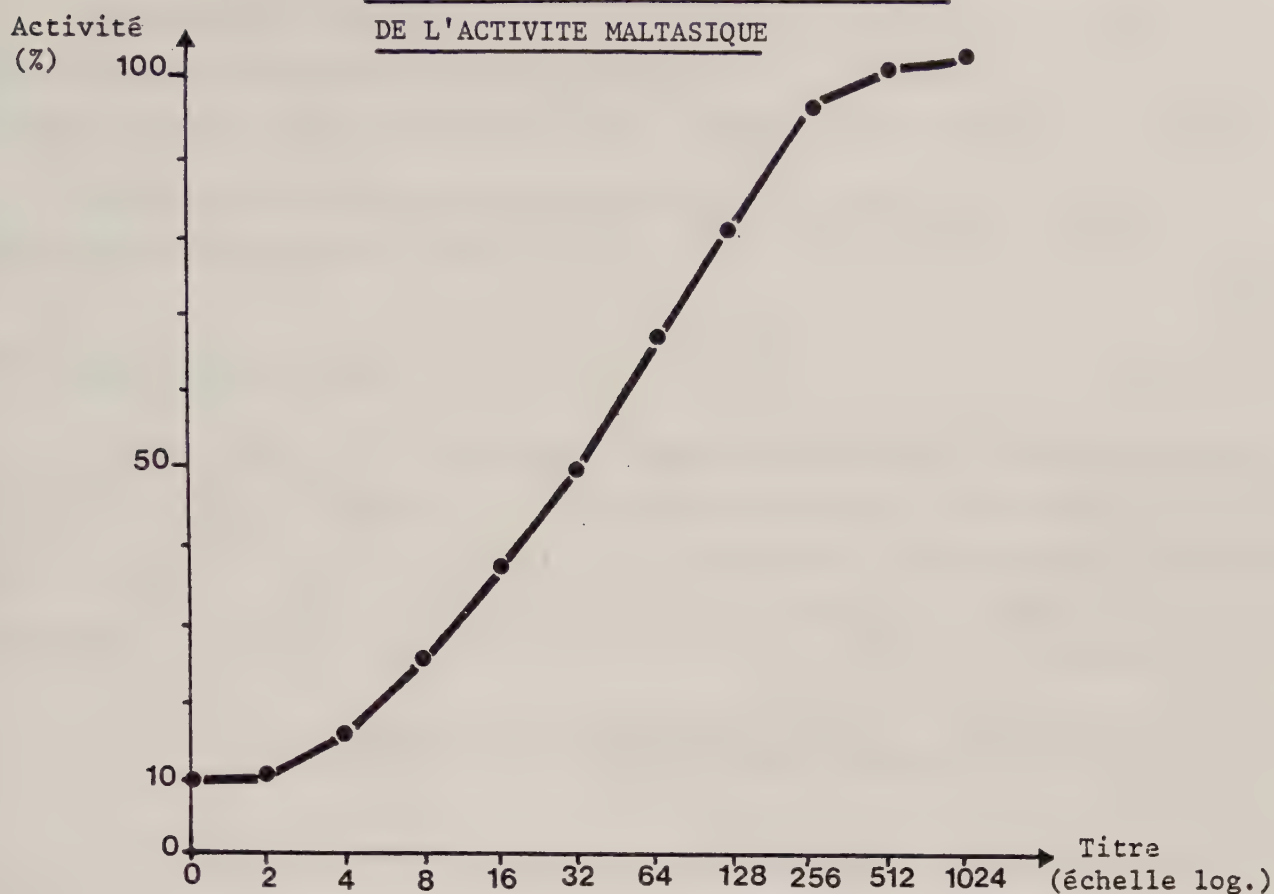
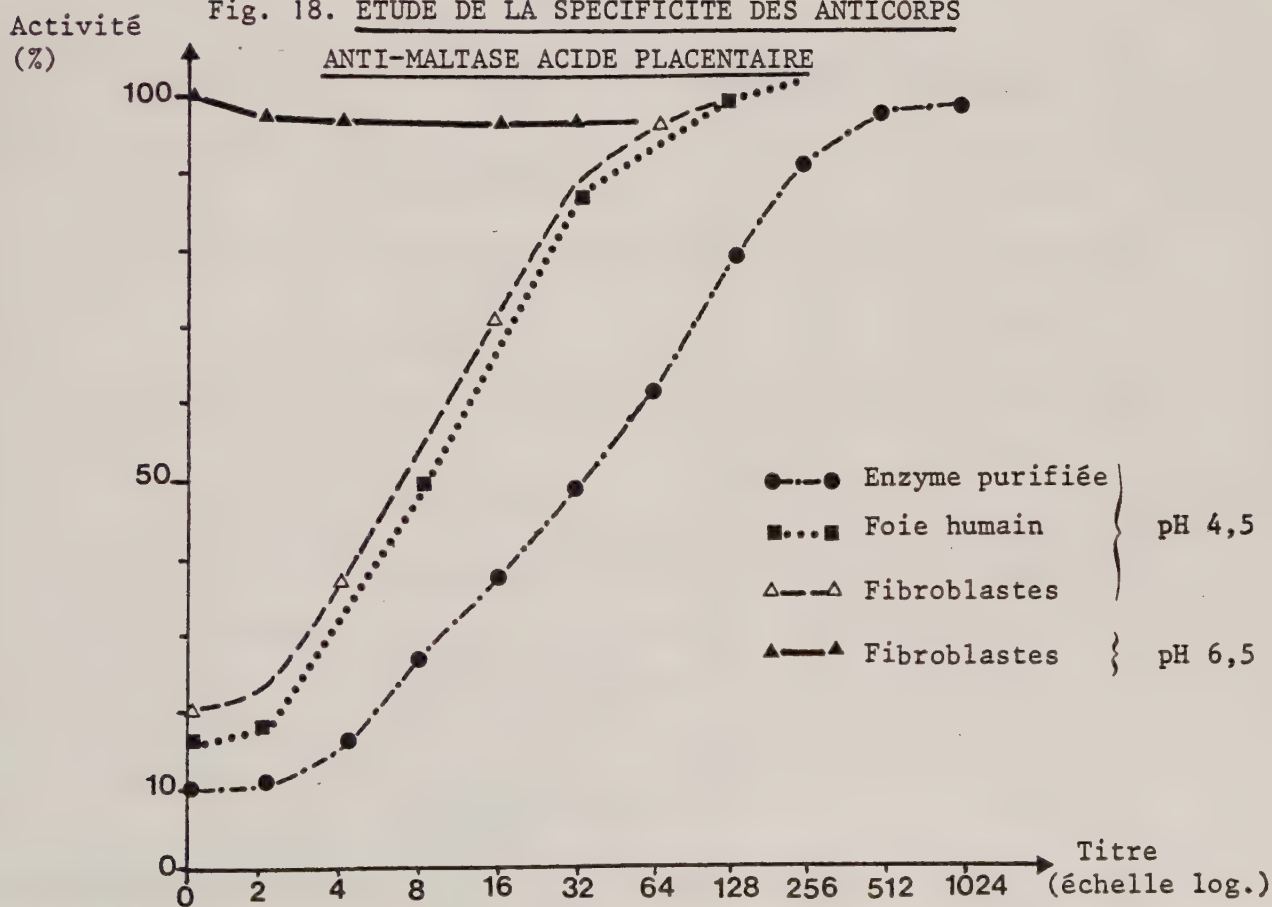


Fig. 18. ETUDE DE LA SPECIFICITE DES ANTICORPS
ANTI-MALTASE ACIDE PLACENTAIRE



II.1.3.2. Spécificité des anticorps :

Les anticorps antimaltase acide placentaire n'ont pas de spécificité d'organe et ils inhibent aussi bien l'enzyme humaine du foie, des fibroblastes (fig. 18) du muscle ou des urines (non montré sur la figure 18) que l'enzyme placentaire.

L'action des anticorps anti-maltase acide est nulle sur l'activité maltasique mesurée à pH 6,5 (fig. 18).

II.2. ETUDE DES PATIENTS

Avant de donner les résultats des études effectuées chez les sept patients, nous rapportons la *fréquence* de la glycogénose de type II par rapport aux autres glycogénoses diagnostiquées dans le laboratoire d'Enzymologie (M. MATHIEU, Pr. J. COTTE) de l'Hôpital DEBROUSSE, puis nous donnons les *valeurs les plus fréquentes* du laboratoire pour le glycogène et les enzymes de la glycogénolyse.

II.2.1. Fréquence de la glycogénose de type II (M. MATHIEU) :

La fréquence des différentes glycogénoses étudiées est présentée dans le tableau XIII (165).

TABLEAU XIII

TYPE DE GLYCOGENOSE	FORME	NOMBRE	FREQUENCE
I	classique pseudo I	15 2	} 19,8 %
II	classique juvénile adulte	2 2 4	} 9,3 %
III	A B non classé	15 9 2	} 30,2 %
V	classique	3	3,5 %
VI	phosphorylase-b système activation non classé	8 5 6	} 22,1 %
	phosphofructokinase musculaire	4	4,6 %
	non identifié	9	10,5 %
	TOTAL	86	100 %

II.2.2. Valeurs les plus fréquentes du glycogène et des enzymes de la glycoéno lyse (M. MATHIEU - Hôpital DEBROUSSE, Rapport INSERM 1974).

Les résultats sont résumés dans les tableaux ci-dessous. Le taux de glycogène est exprimé en grammes pour 100 g de tissu humide, et les activités enzymatiques en unités par gramme, c'est-à-dire en micromoles de substrat transformé par minute dans les conditions de la réaction et rapportées au gramme de tissu humide ; pour la détermination de l'amylo-1,6-glucosidase sur le substrat radioactif, une unité représente le centième de la radio-activité incubée qui a été incorporée en une heure au glycogène pour 100 g de tissu humide.

II.2.2.1. *Foie :*

ANALYSE	NOMBRE DE DETERMINATIONS	MOYENNE DES VALEURS	ECART-TYPE	VALEURS LES PLUS FREQUENTES
Glycogène	23	3,05	1,26	< 4,3
α -1,4-glucosidase acide (substrat maltose)	34	0,53	0,21	> 0,32
glucose-6-Phosphatase	32	5,13	3,36	> 1,8
Phosphorylase + AMP	20	18,6	4,13	>14,4
- AMP	10	15,7	5,75	>10
Amylo-1,6-glucosidase				
.hydrolyse limite dextrine	33	0,66	0,27	> 0,39
.incorporation du ¹⁴ C-glucose.	12	58	21	>37

II.2.2.2. *Muscle :*

ANALYSE	NOMBRE DE DETERMINATIONS	MOYENNE DES VALEURS	ECART-TYPE	VALEURS LES PLUS FREQUENTES
Glycogène	111	0,95	0,30	< 1,55
α -1,4-glucosidase acide (substrat maltose)	119	0,05	0,013	> 0,037
Phosphorylase + AMP	109	72,6	19,7	>33
- AMP	58	20,6		
Amylo-1,6-glucosidase				
.hydrolyse limite dextrine	50	0,35	0,11	> 0,24
.incorporation du ¹⁴ C-glucose	13	59,6	21,3	>38

ANALYSE	NOMBRE DE DETERMINATIONS	MOYENNE DES VALEURS	ECART-TYPE	VALEURS LES PLUS FREQUENTES
α -1,4-glucosidase acide				
. Substrat : maltose (U/mg Pts)	92	6,2	1,95	> 2,3
. Substrat : MU-glucoside (U/mg Pts)	51	0,23	0,09	> 0,05

Ces valeurs les plus fréquentes seront rappelées entre parenthèses dans tous les tableaux exprimant les résultats des études biochimiques effectuées chez les sept patients.

II.2.3. Résultats des malades :

II.2.3.1. *Patient n°1* :

II.2.3.1.1. *Etude morphologique*

- étude macroscopique (Pr. M. BETHENOD)

A l'autopsie, l'hypertrophie du *coeur* est considérable (poids : 90 g, valeur normale : 20 g) et porte essentiellement sur le ventricule gauche. La cavité ventriculaire est presque virtuelle. Le myocarde est de coloration jaunâtre et de consistance ferme.

Le *foie* présente un aspect normal, il n'est pas hypertrophié.

- étude en microscopie optique et histochimie (Dr. J. GILLY)

Le *myocarde* présente une *vacuolisation* de toutes les fibres qui apparaissent optiquement vides avec un noyau central. Le carmin de Best colore partiellement ces vacuoles.

Le *foie* a une architecture générale conservée. Dans le cytoplasme des hépatocytes, on observe des vacuoles de petites dimensions d'aspect muriforme qui se colorent légèrement au carmin de Best.

Les *fibres musculaires* (diaphragme, paroi de l'abdomen) sont le siège d'une vacuolisation intense, certaines sont optiquement vides alors que d'autres ont conservé leur striation qui est repoussée à la périphérie par les vacuoles.

L'examen en microscopie électronique n'a pas été pratiqué.

II.2.3.1.2. Etude biochimique :

Le taux du *glycogène* dans le coeur et le foie est très augmenté alors que dans le muscle, l'élévation du polysaccharide est très modérée.

L'absence d'activité α -1,4-glucosidasique à pH 4 est retrouvée dans ces trois tissus. On note également une diminution de l'activité de la phosphorylase mesurée en présence d'AMP.

Dans les leucocytes, l'activité de la maltase acide est très abaissée mais non nulle. Nous avons rassemblé les résultats de ces déterminations dans le tableau XIV :

TABEAU XIV - RESULTATS DES ETUDES BIOCHIMIQUES EFFECTUEES CHEZ LE
PATIENT N° 1

Analyses	Coeur	Foie	Muscle squelettique	Leucocytes
Glycogène g %	9,7 (< 1)	11 (< 4,3)	2,5 (< 1,55)	
α -1,4-glucosidase pH 4 U/g (substrat maltose)	0 (0,15)	0 (> 0,32)	0 (> 0,037)	0,78 (> 2,3)
Phosphorylase U/g	7 (> 17)	2,4 (> 14,4)	27 (> 33)	
Glucose-6-Phosphatase U/g		4,4 (> 1,8)		
Amylo-1,6-glucosidase				
. limite dextrine U/g	0,17	0,35 (> 0,39)	0,40 (> 0,24)	
. ^{14} C-glucose	16		31 (> 38)	

Il nous a paru intéressant de décongeler les prélèvements de coeur et de muscle (que nous avons conservé depuis 10 ans dans notre congélateur à -80°C) afin de rechercher la présence éventuelle de protéines réagissant avec les

anticorps antimaltase acide. Nous avons appliqué une technique par consommation des anticorps voisine de celle décrite par de BARSY (54), mais le substrat utilisé est le MU-Glucoside. Les anticorps antimaltase acide sont mélangés avec l'homogénat de foie ou de coeur à la température du laboratoire 15 minutes avant l'addition de l'enzyme placentaire purifiée.

Le tableau XV donne les résultats de cette étude :

TABLEAU XV - RECHERCHE D'UN PROTEINE IMMUNOLOGIQUEMENT REACTIVE
DANS LE COEUR ET LE FOIE DU PATIENT N°1 PAR LA
TECHNIQUE DE CONSOMMATION DES ANTICORPS
(substrat : MU-glucoside).

Tissu étudié	Activité α-glucosidasique mU/ml pH 4	Activité α-1,4 glucosidasique inhibée à pH 4 (mU / ml)		

		AC pur	: AC au 1/2	: AC au 1/4
1 : α -glucosidase purifiée + albumine (5 mg/ml)	9,4	9	: 7,7	: 3,85
2 : Homogénat foie normal au 1/50	3,4	3,3	: 3,1	: 3,0
3 : 1 + 2	17,1	16,5	: 15	: 12,3
4 : Foie normal inactivé à pH 10,5 au 1/50	0,05			
5 : 1 + 4	11,9	11,8	: 11,5	: 10,9
6 : Homogénat foie patient 1 au 1/10	0,16			
7 : 1 + 6	12,05	11,7	: 11	: 9,8
8 : Homogénat coeur patient 1 au 1/10	0,11			
9 : 1 + 8	13,9	13,7	: 12,4	: 10

L'interprétation de ces différents dosages sera envisagée dans le chapitre "discussion".

II.2.3.2 Patient n° 2 :

II.2.3.2.1 Etude morphologique

- Etude microscopique (Dr. T. LEUNG)

Foie :

Le cytoplasme des hépatocytes renferme de nombreuses vacuoles de taille variable colorables au carmin de Best et délimitées par une membrane unitaire. Le glycogène accumulé est sous forme de particules α et β (Fig.19.).

Les cellules de Küpfer présentent également des amas de glycogène intralysosomiaux.

Muscle : (quadriceps)

En microscopie optique, on note la présence de fibres fortement vacuolisées colorables au carmin de Best à côté de fibres musculaires normales.

Au microscope électronique, la surcharge glycogénique est localisée principalement à des cavités arrondies limitées par une membrane unitaire, et dont la morphologie évoque tout à fait les *lysosomes*. Le glycogène accumulé est sous forme monoparticulaire. En outre, il existe des foyers de dégénérescence avec présence d'autophagosomes.

II.2.3.2.2. Etude biochimique

La glycémie, la lactacidémie et l'épreuve au glucagon sont normales. La cholestérolémie est élevée (2,24 g/l) ainsi que les lipides totaux (8,4 g/l). Les activités enzymatiques dans le sérum sont élevées : créatine kinase (138 U/l, valeurs les plus fréquentes : < 50 U/l), lactico-déshydrogénases (566 U/l, valeurs les plus fréquentes : < 195 U/l), transaminases (ASAT : 119 U/l; ALAT : 139 U/l, valeurs les plus fréquentes < 20 U/l).

Foie :

L'augmentation du contenu en glycogène est très importante.

L'activité maltasique à pH 4 n'est pas détectable (substrat : maltose).

Fig 19a - Etude ultrastructurale d'une biopsie
hépatique du patient n° 2 (Dr. T. LEUNG)

Fig 19b - Etude ultrastructurale d'une biopsie
musculaire du patient n° 4 (Dr. H. CARRIER)

TABEAU XVI - RESULTATS DES ETUDES BIOCHIMIQUES EFFECTUEES SUR UNE
BIOPSIE HEPATIQUE DU PATIENT N°2

Analyses	Valeurs trouvées
Glycogène g %	17,7 (< 4,3)
α-1,4-glucosidase pH 4 (U/g)	
. substrat : maltose	0 (> 0,32)
Glucose-6-phosphatase	5 (> 1,8)
Phosphorylase (U/g)	
+ AMP	16,4 (> 14,4)
- AMP	12,5 (> 10)
Amylo-1,6-glucosidase (U/g)	
. hydrolyse limite dextrine	1,2 (> 0,39)

Muscle :

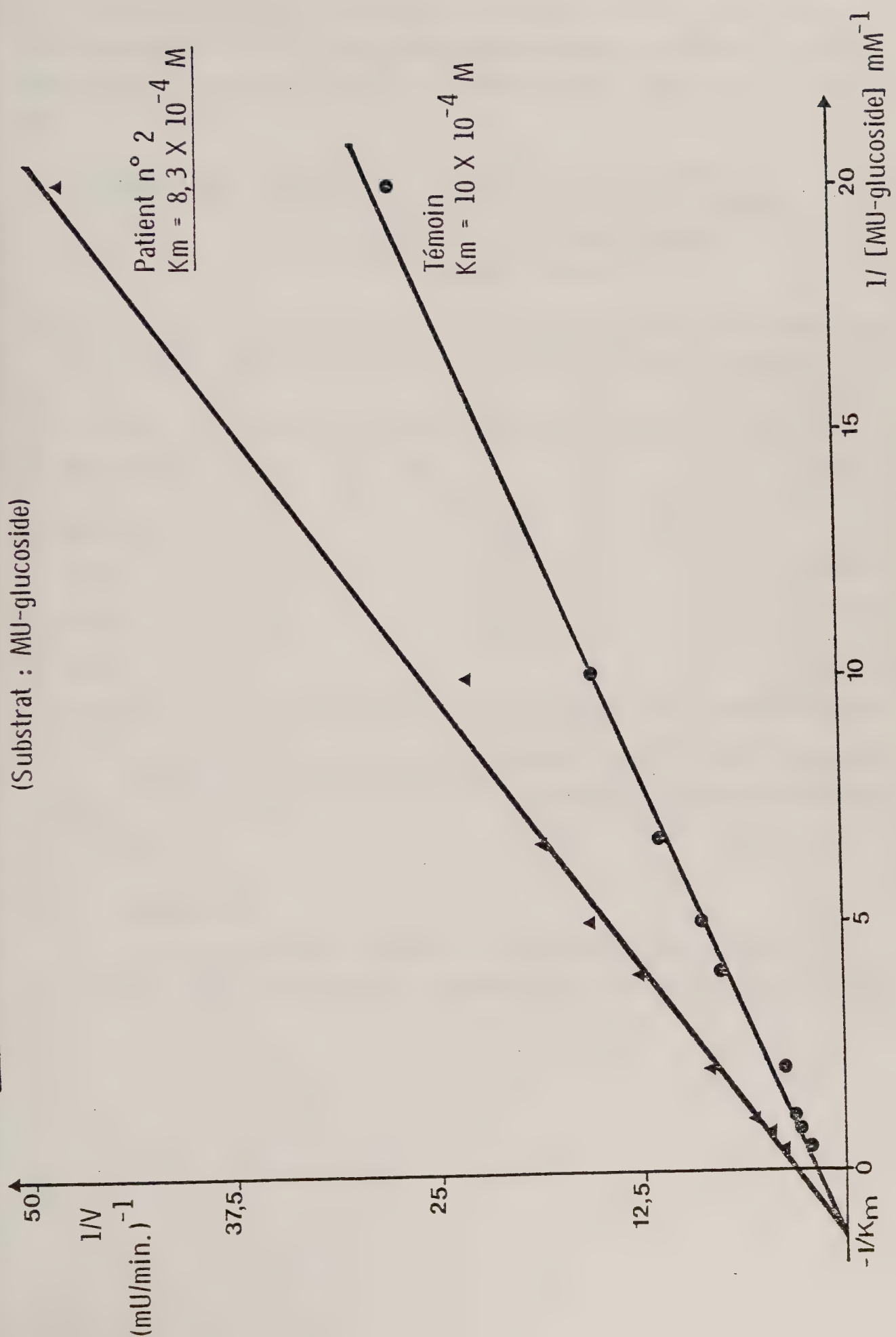
L'activité de l'α - 1,4-glucosidase acide musculaire est très faible. Deux déterminations ont été effectuées, les résultats ont été trouvés à 0,021 U/g et 0,007 U/g (limite retenue > 0,037).

La Km de l'enzyme musculaire déterminée vis-à-vis du substrat MU-glucoside (fig. 20) est peu différente de celle d'un muscle témoin (Km malade n° 2 : $8,3 \times 10^{-4}$ M, Km témoin : 10×10^{-4} M).

Leucocytes :

L'activité de la maltase leucocytaire à pH 4 a été déterminée chez le patient n° 2, le patient n°3 (soeur du patient n°2) et chez leurs parents (tableau XVII).

Fig. 20. DETERMINATION DE LA K_m DE L' α -1, 4-GLUCOSIDASE MUSCULAIRE DU RATIENT N° 2.



On note une grande variabilité des résultats obtenus ; pour chacun des patients n°2 et n°3, l'activité enzymatique mesurée à 3 reprises se situe une seule fois en-dessous de la limite inférieure des valeurs les plus fréquentes.

TABLEAU XVII - RESULTATS DES DETERMINATIONS DE L'ACTIVITE DE
L' α -1,4-GLUCOSIDASE A pH 4 DANS LES LEUCOCYTES
DES PATIENTS N°2, N°3 ET DE LEURS PARENTS.
(substrat : maltose)

Sujet étudié	16.10.72	21.3.73	1.10.73	9.11.73	29.5.74	Km (MU-glucose) side)
Patient n°2	1,3 (>2,3)	3,9			2,5	$4,4 \times 10^{-4} M$
Patient n°3			2,9	2,2	3,9	
Père	5	6,1				$5,4 \times 10^{-4} M$
Mère	5	7,2				$5 \times 10^{-4} M$
Témoin						$5 \times 10^{-4} M$

Les Km de l'enzyme leucocytaire ont été calculées selon la représentation de HANES et WOOLF (Fig. 21) ; elles sont comparables à celles des leucocytes témoins.

Fibroblastes :

Les fibroblastes des patients n°2, n°3 et de leurs parents ont été analysés par rapport à des témoins au même stade de subculture (Tableau XVIII).

Fig. 21. DETERMINATION DE LA K_m DE L'OX-1, 4-GLUCOSIDASE ACIDE LEUCOCYTAIRE DU PATIENT N° 2.

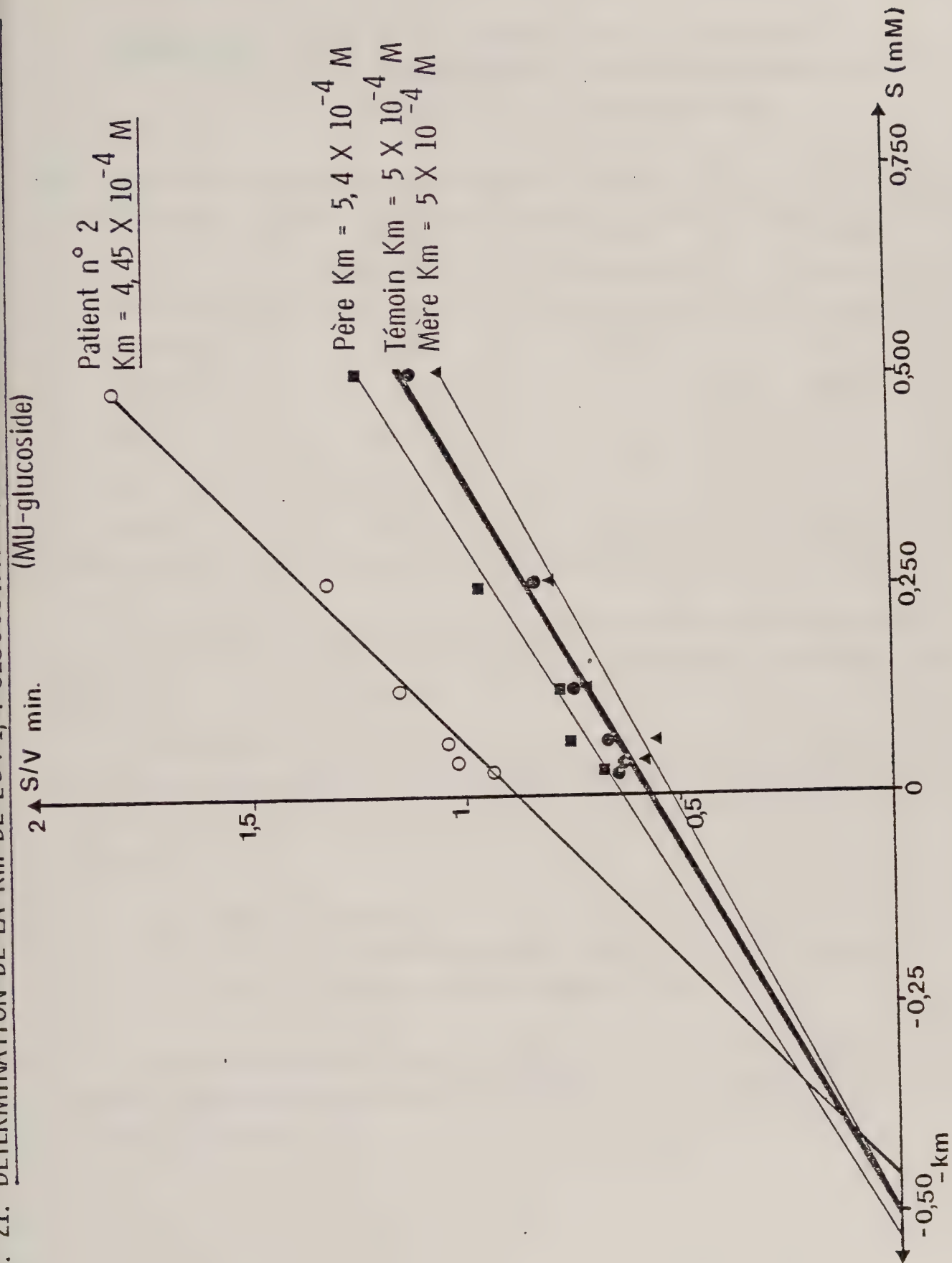


TABLEAU XVIII - RESULTATS DES DETERMINATIONS DE L'ACTIVITE DE
L' α -1,4-GLUCOSIDASE ACIDE DANS LES FIBROBLASTES
DES PATIENTS N°2, N°3 ET DE LEURS PARENTS.

Sujet étudié	1ère détermination souche 1 (subculture 5)	2ème détermination souche 1 (subculture 10)	3ème détermination souche 2 (subculture 4)
Patient n°2	0,007	0,19	0,14
Patient n°3			0,08
Père	0,17		
Mère	0,24		
Témoin	0,29	0,27	0,82

La présence d'une activité enzymatique résiduelle dans les fibroblastes en culture nous a incités à rechercher la possibilité de stimulation de la synthèse de la maltase acide.

L'activation par les stéroïdes de l' α -1,4-glucosidase acide des fibroblastes, du patient n°2 a été envisagée (166). De l'acétate ou de l'hémisuccinate d'hydrocortisone ont été ajoutés aux milieux de culture à 3 moments différents:

- au cours du repiquage.
- au cours de la phase de croissance (3ème jour après le repiquage)
- au cours de la phase quiescente (après le 5ème jour).

Seules les hormones ajoutées au cours de la phase de croissance stimulent l'activité enzymatique qui est amenée à un taux normal après 10 jours de culture.

TABEAU XIX - ESSAI D'ACTIVATION DE L' α -1,4-GLUCOSIDASE ACIDE DES FIBROBLASTES PAR LES STÉROÏDES.
(substrat : MU-glucoside)

Stéroïde	Activité (mU/mg protéines)		
	patient n°2	Père	Mère
Acétate d'hydrocortisone	0 μ g/ml	0,006	0,060
	10 μ g/ml	0,003	0,080
	100 μ g/ml	0,010	0,050
Hémisuccinate d'hydrocortisone	0 μ g/ml	0,006	0,06
	10 μ g/ml	0,25	0,12
	100 μ g/ml	0,18	0,13

- les concentrations en stéroïdes sont exprimées en μ g par ml de milieu de culture.

- Les activités enzymatiques sont déterminées 10 jours après addition du stéroïde.

Urines :

Nous avons étudié l'influence du pH sur l'activité de l' α -1,4-glucosidase urinaire du patient n°2 (fig. 22).

Le pH optimum d'activité se situe à 6, et l'activité enzymatique n'est pas inhibée par les anticorps antimaltase acide. Pour les urines témoin le pH optimum se situe à 4,5 et l'activité enzymatique est inhibée à pH acide par les anticorps spécifiques.

L'influence du chlorure de potassium sur l'activité maltasique urinaire à pH 4,5 est très intéressante chez le patient 2 (fig. 23). En présence de KCl, une très nette inhibition est observée alors que chez les témoins une activation importante se produit.

Fig. 22. INFLUENCE DU pH SUR L'ACTIVITE DE
L' α -1,4-GLUCOSIDASE URINAIRE DU PATIENT N° 2

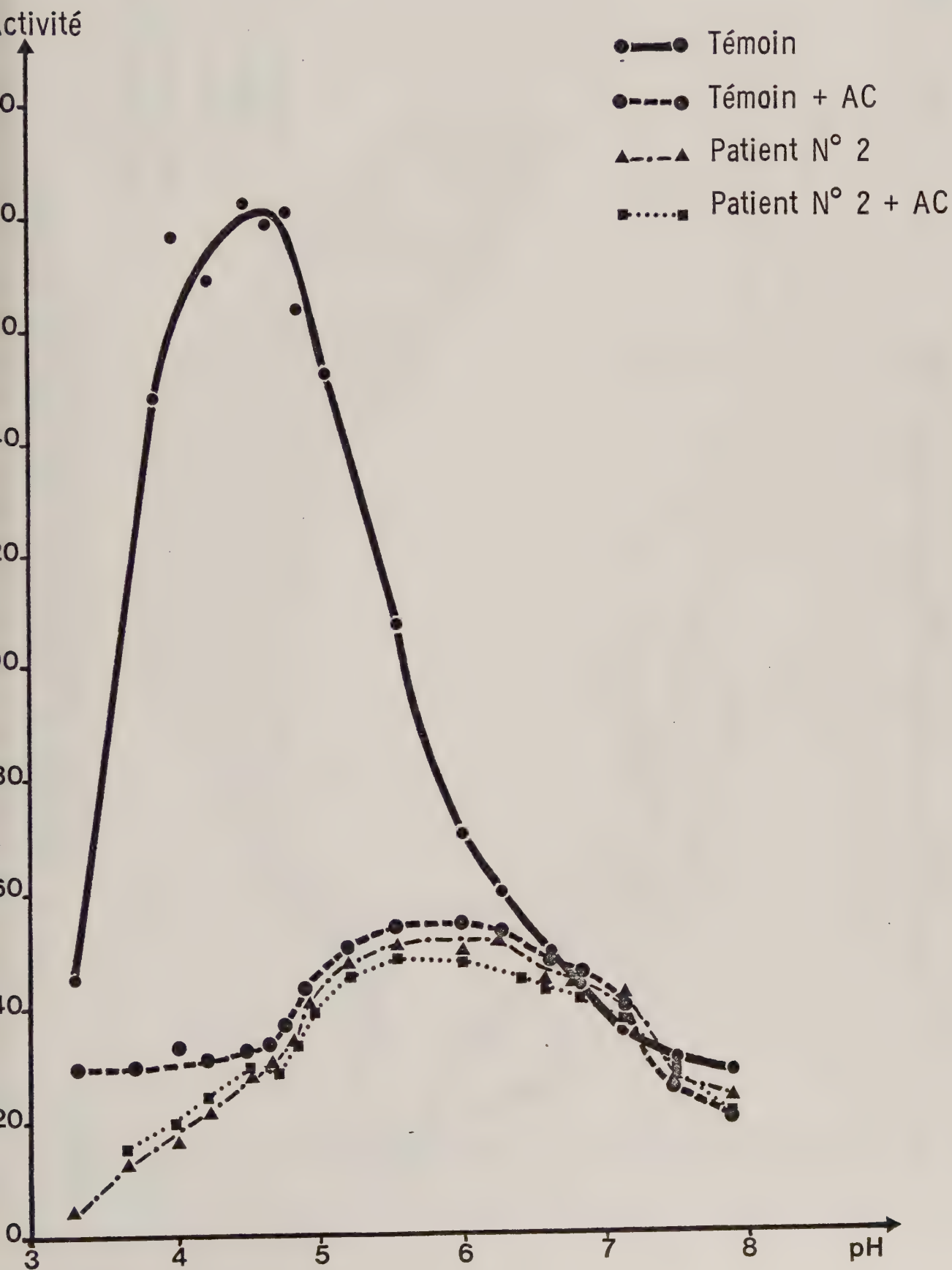
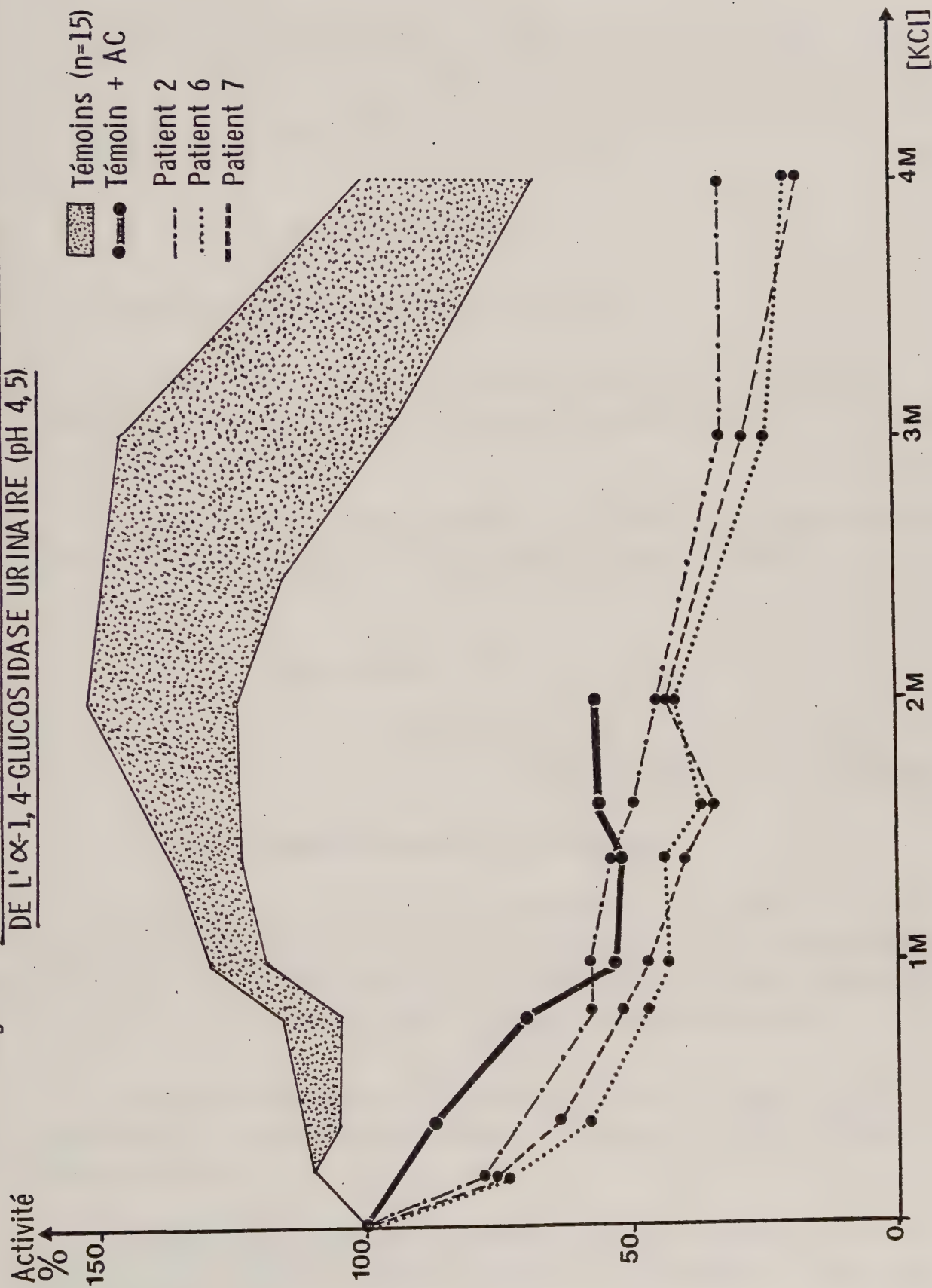


Fig. 23. INFLUENCE DU CHLORURE DE POTASSIUM SUR L'ACTIVITE
DE L' α -1, 4-GLUCOSIDASE URINAIRE (pH 4,5)



II.2.3.2.3. Etude électrophorétique

Le tracé électrophorétique sur acétate de cellulose obtenu à partir d'extraits de fibroblastes est le même pour le malade n°2 que pour ses parents et un témoin. (166). Cependant, l'intensité de la fluorescence des bandes est nettement plus faible pour le sujet n°2 (Fig. 24).

II.2.3.3 Patient n°3 :

Seule l'étude biochimique a été effectuée.

Le cholestérol sanguin est élevé (2,8 g/l). Les activités de la créatine - kinase (165 U/l) et de la lacticodéshydrogénase (313 U/l) dans le sérum sont augmentées.

Les résultats des études biochimiques des leucocytes et des fibroblastes ont été rapportés précédemment. (tableau XVII et tableau XVIII).

II.2.3.4 Patient n°4 :

II.2.3.4.1 Etude microscopique (deltoïde,
jambier antérieur) (Dr. H. CARRIER)

- étude en microscopie optique et histochimie

L'aspect observé est celui d'une "myopathie vacuolaire". On note la présence de grosses vacuoles irrégulières le plus souvent sous-sarcolemmiques renfermant un contenu finement grenu. Un grand nombre de fibres apparaissent "criblées" par de multiples petites vacuoles inter-myofibrillaires.

La nature glycogénique du contenu vacuolaire est appuyée par les colorations PAS et au Carmin de Best. En outre, certaines vacuoles renferment des dépôts basophiles.

En histoenzymologie, la réaction du contenu des vacuoles pour la phosphatase acide est très positive, dépassant généralement les limites de ces vacuoles.

Père Mère Patient N°2 Témoin

Fig 24 - Comportement électrophorétique de l'alpha-1,4-glucosidase d'un extrait de fibroblastes du patient n° 2. (électrophorèse sur acétate de cellulose).

- étude en microscopie électronique

Dans le muscle deltoïde, le glycogène est réparti de façon homogène alors que dans le muscle jambier, le contenu est plus hétérogène.

Des structures arrondies sont fréquemment observées dans les grandes vacuoles, elles sont de taille variable, sont limitées par une membrane-unité et renferment du glycogène: il s'agit de *lysosomes thésaurisateurs* (Fig. 19).

Certaines formations vacuolaires sont interprétées comme des auto-lysosomes.

II.2.3.4.2 Etude biochimique

Les activités des transaminases et de la créatine-kinase du sérum sont normales alors que celle de la lactico-déshydrogénase est augmentée (329 U/l).

Muscle (jambier antérieur) :

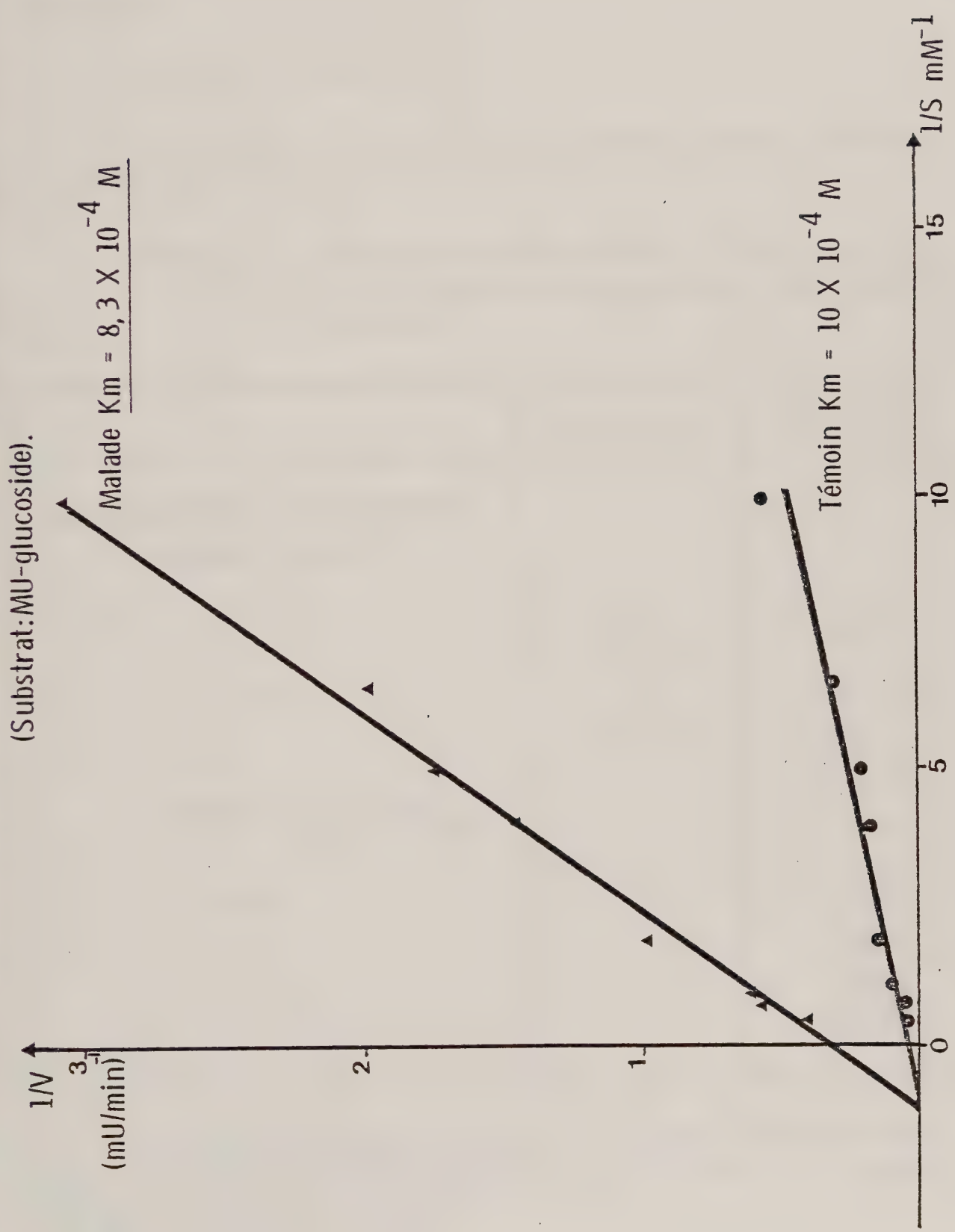
Les résultats de l'analyse biochimique du muscle sont rassemblés dans le tableau XX. La concentration en *glycogène* est normale alors que l'*activité maltasique* mesurée à pH acide est effondrée.

TABEAU XX - RESULTATS DES ETUDES BIOCHIMIQUES EFFECTUEES SUR UNE BIOPSIE MUSCULAIRE DU PATIENT N°4

Glycogène g%	α-1,4-glucosidase U/g				Km MU- glucoside	phosphorylase	
	substrat maltose		substrat MU-glucoside				
	pH4	pH 6,5	pH4	pH 6,5		+ AMP	- AMP
	:	:	:	:		:	:
0,80	0,003	0,02	0,64	8,36	$8,3 \times 10^{-4} M$	41	20
(≤1,55)	(>0,037)	(>0,01)	(7,8)	(9,5)	($10 \times 10^{-4} M$)	(≥33)	(20)
	:	:	:	:		:	:
	:	:	:	:		:	:
	:	:	:	:		:	:

L'influence de la concentration en MU-glucoside sur l'activité de l'enzyme musculaire est représentée sur la figure 25 ($K_m = 8,3 \times 10^{-4} M$).

Fig. 25. DETERMINATION DE LA K_m DE L' α -1, 4-GLUCOSIDASE ACIDE MUSCULAIRE DU PATIENT N 4.



Nous avons également étudié l'influence du pH sur l'activité de l'enzyme musculaire vis-à-vis du substrat MU-glucoside (Fig. 26). Le pic d'activité à pH 4, présent chez les sujets normaux, a disparu ; à pH 6,5, le pic d'activité est conservé.

Leucocytes - fibroblastes :

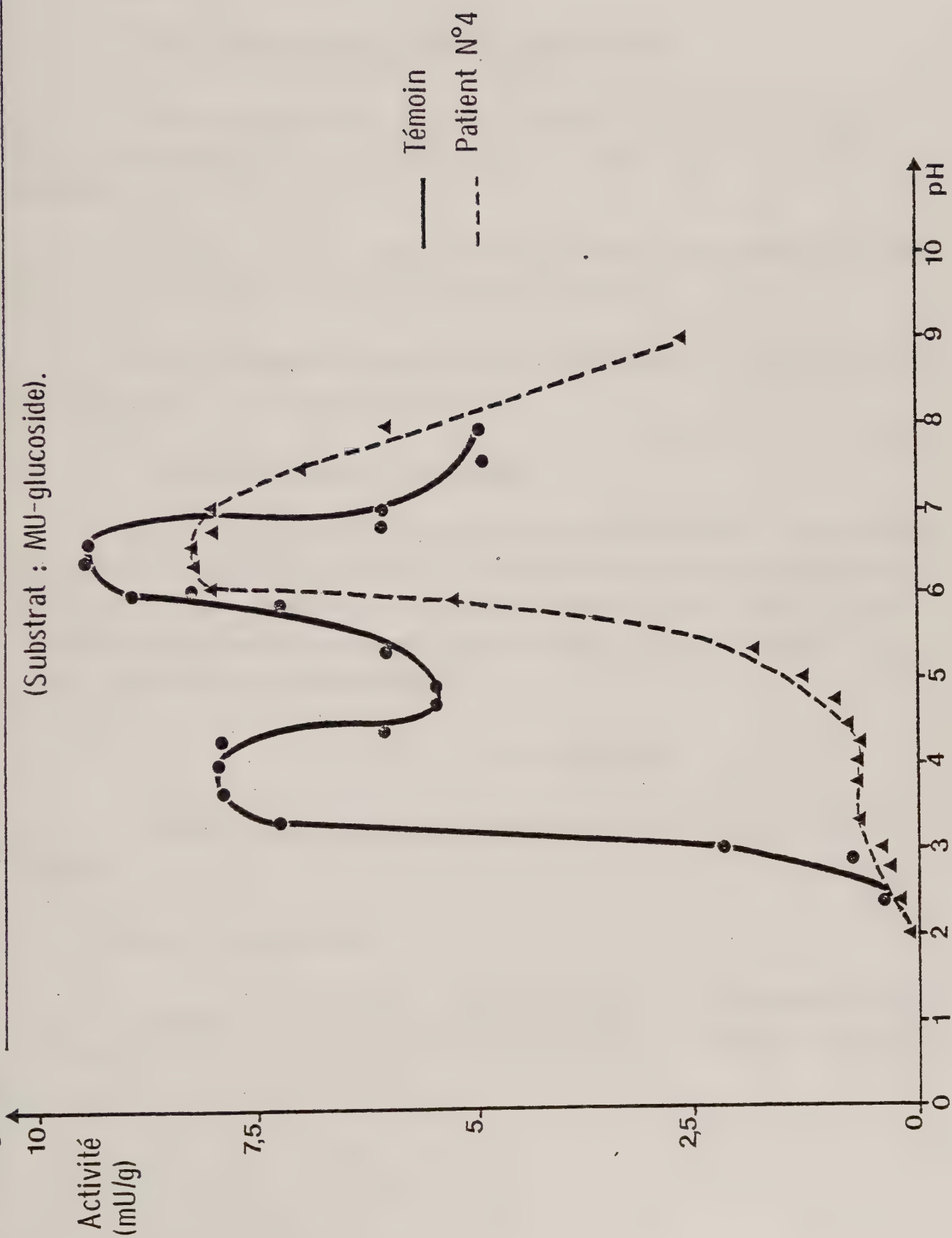
Le tableau XXI donne les résultats de l'étude enzymatique acide des leucocytes et des fibroblastes.

TABLEAU XXI - RESULTATS DES DETERMINATIONS DE L'ACTIVITE DE
L' α -1,4-GLUCOSIDASE DES LEUCOCYTES ET DES FIBROBLASTES
DU PATIENT N°4

	Leucocytes	Fibroblastes
<u>α-1,4 glucosidase (U/mg protéines)</u>		
. <u>substrat</u> : maltose		
- pH 4	5 (> 2,3)	3,2 (18)
- pH 6,5	8,1 (> 4,4)	9 (10)
. <u>substrat</u> : MU-glucoside (mU/mg protéines)		
- pH 4		0,055 (0,53)
- pH 6,5		0,91 (0,83)

L'activité enzymatique mesurée dans les leucocytes est située dans l'intervalle des valeurs les plus fréquentes alors que l'activité de la maltase acide des fibroblastes est effondrée.

Fig. 26. INFLUENCE DU pH SUR L'ACTIVITE DE L' α -1,4-GLUCOSIDASE MUSCULAIRE DU PATIENT N°4.



II.2.3.5 patient n°5

II.2.3.5.1. *Etude microscopique* (Dr H. CARRIER)

Muscle :

- étude en microscopie optique et histochimie

Le muscle deltoïde est le siège d'une myopathie "vacuolaire". Les vacuoles subsarcolemmiques sont nombreuses et volumineuses avec un contenu granuleux qui se révèle PAS positif.

Au niveau du muscle jambier, les lésions sont plus discrètes. On note également la présence de dépôts d'un matériel basophile.

L'étude histoenzymologique montre une réaction pour la phosphatase acide très positive à l'intérieur des vacuoles.

- étude en microscopie électronique

L'aspect observé est très voisin de celui décrit pour le malade précédent, mais l'intensité des lésions est plus grande avec un aspect dégénératif fréquent dans les myofibrilles. Le glycogène accumulé est, ou dispersé au sein des vacuoles non limitées par une membrane unique, ou intra-lysosomal ou encore contenu dans des autolysosomes.

II.2.3.5.2 *Etude biochimique*

L'activité des enzymes (ASAT, ALAT, LDH, et CK) dans le sérum est normale.

Muscle : (deltoïde)

Comme pour le patient n°4, le contenu du muscle en glycogène est normal et l'activité de l' α -1,4 glucosidase acide est très abaissée (tableau XXII).

TABLEAU XXII - RESULTATS DES ETUDES BIOCHIMIQUES EFFECTUEES SUR UNE BIOPSIE MUSCULAIRE DU PATIENT N°5

glycogène g%	α-1,4-glucosidase				Km MU glucoside	phosphorylase			
	substrat maltose (U/mg)		substrat MU-glucoside (mU/mg)			+ AMP	- AMP		
	pH 4	: pH 6,5	pH 4	: pH 6,5					
	:	:	:	:					
0,50	0,003	:	0,02	0,25	:	6,9	$7,7 \times 10^{-4} \text{M}$	17	11,2
(< 1,55)	(>0,037)	:	(>0,01)	(6,9)	:	(15,9)	$(10 \times 10^{-4} \text{M})$	(>33)	(20)
	:	:	:	:	:	:			

La figure 27 représente l'influence de la concentration en MU-glucoside sur l'activité de la maltase acide musculaire et la figure 28 montre l'influence du pH sur l'activité enzymatique.

A pH 4 l'activité enzymatique est presque nulle, mais le pic à pH 6,5 est présent.

Leucocytes et fibroblastes :

L'activité de la maltase leucocytaire mesurée à pH 4 est située dans l'intervalle des valeurs les plus fréquentes. Dans les fibroblastes, le déficit en α-1,4-glucosidase acide est patent (tableau XXIII).

L'activité maltasique résiduelle des fibroblastes peut être inhibée par les anticorps spécifiques antimaltase acide (Fig. 29).

Fig. 27. DETERMINATION DE LA K_m DE L' α -1, 4-GLUCOSIDASE ACIDE MUSCULAIRE DU PATIENT N°5.

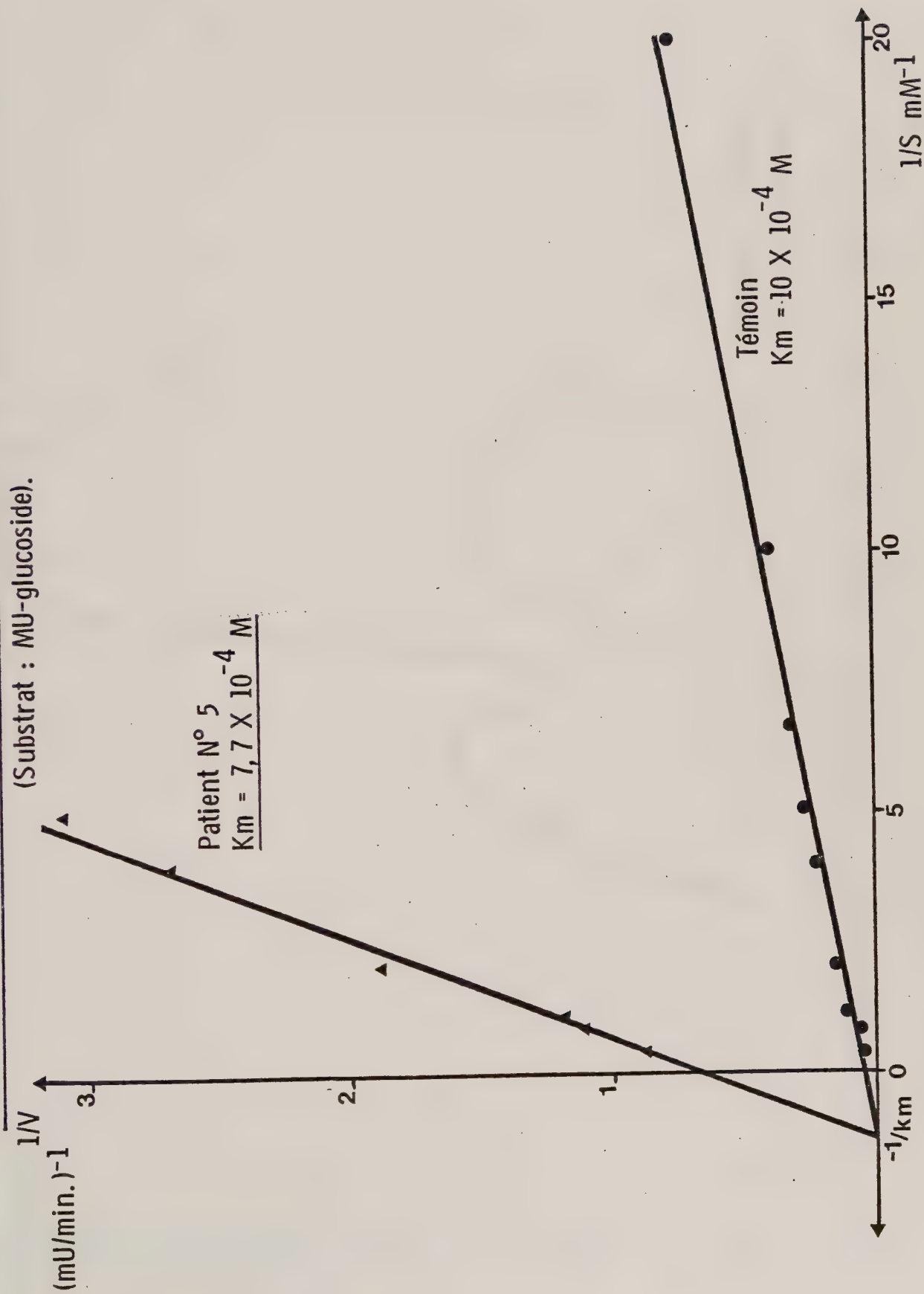


Fig. 28. INFLUENCE DU pH SUR L'ACTIVITE DE L'EX 1,4 GLUCOSIDASE MOLECULAIRE DU PATIENT N° 5.

(Substrat : MU-glucoside)

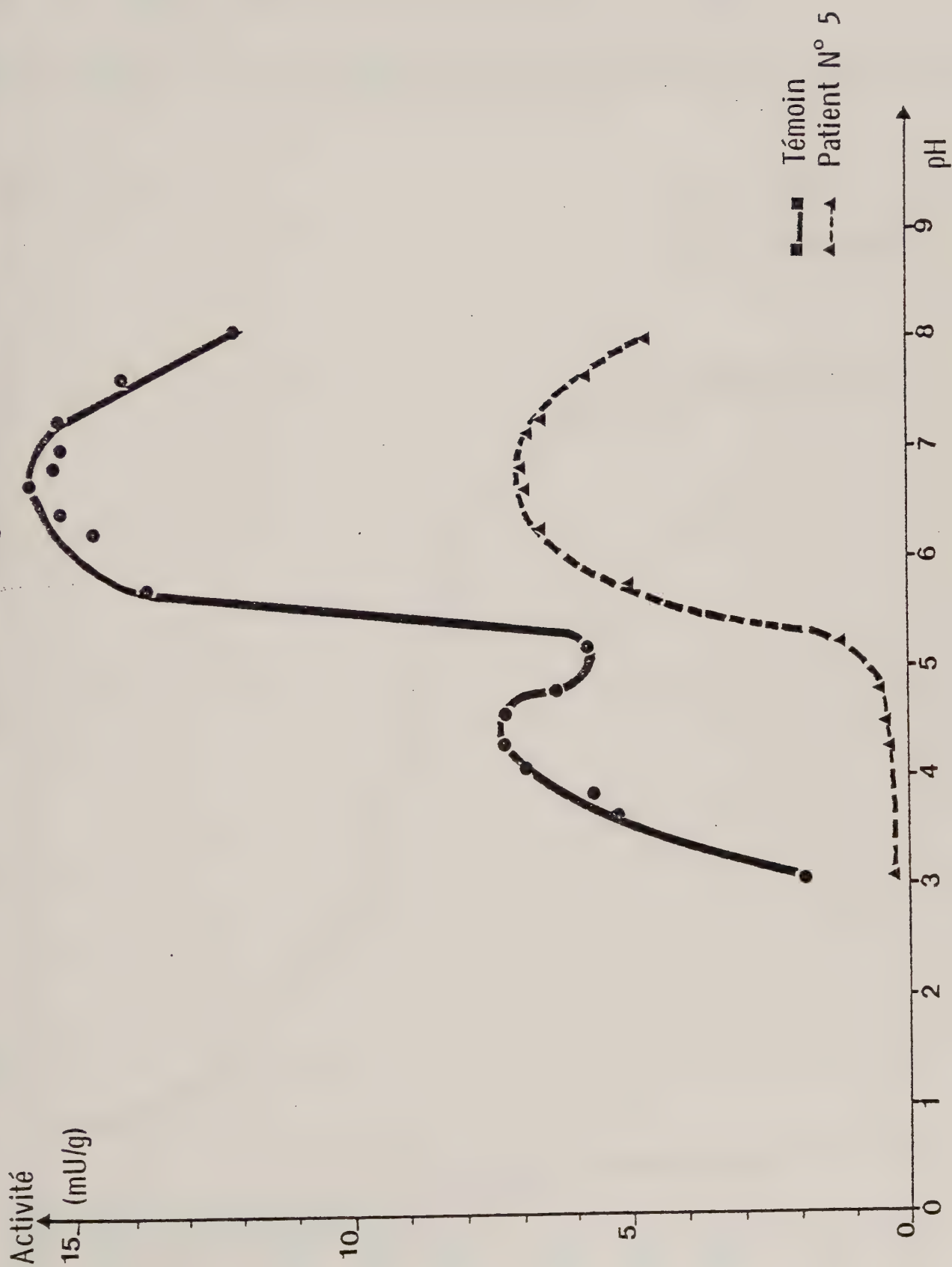


Fig. 29. INHIBITION DE L'ACTIVITE DE L' α -1,4-GLUCOSIDASE ACIDE
DES FIBROBLASTES DU PATIENT N°5 PAR LES ANTICORPS SPECIFIQUES

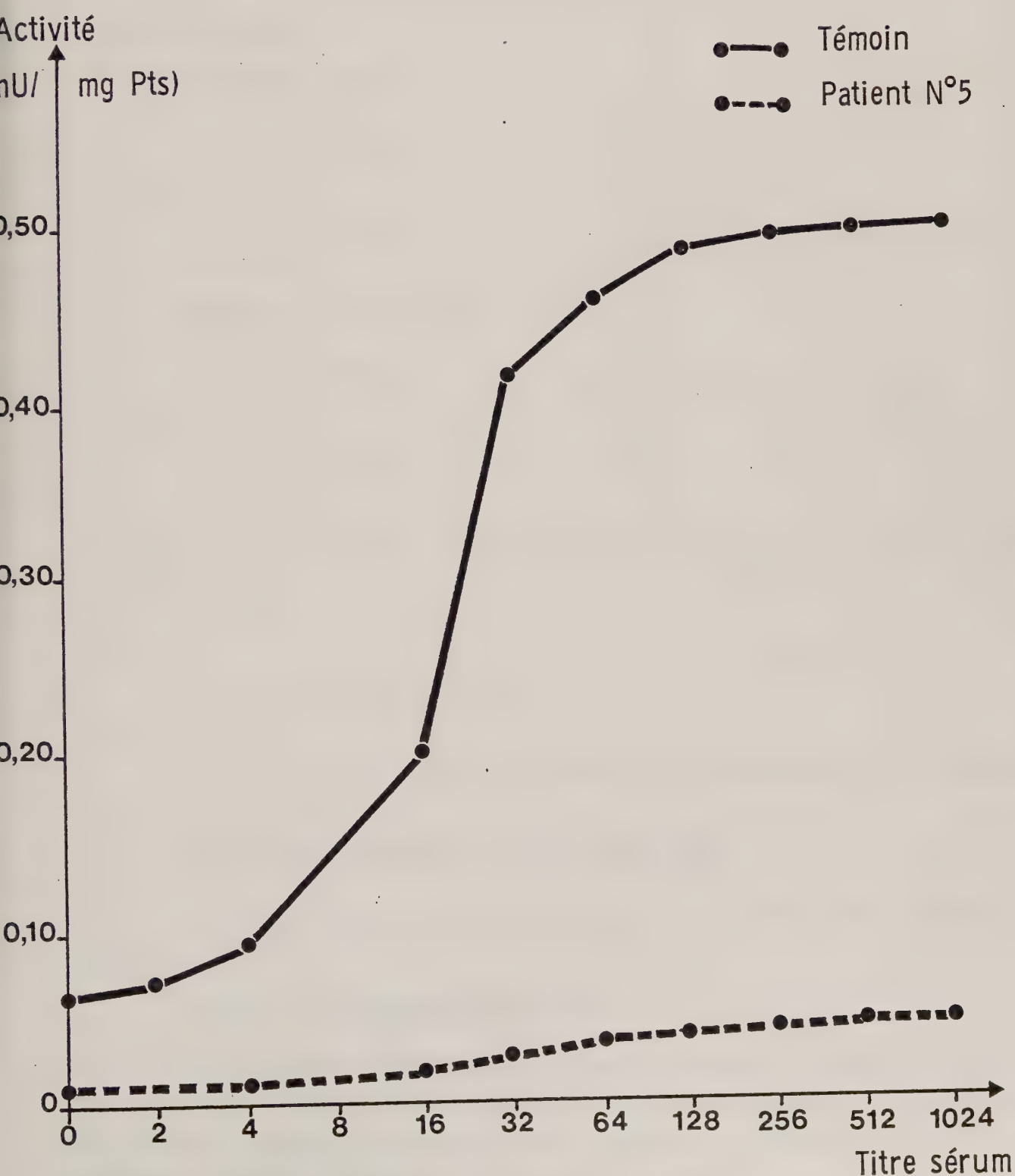


TABLEAU XXIII - RESULTATS DES DETERMINATIONS DE L'ACTIVITE DE
L ' α -1,4-GLUCOSIDASE DES LEUCOCYTES ET DES
FIBROBLASTES DU PATIENT N°5

	Leucocytes	Fibroblastes
<u>α-1,4-glucosidase</u>		
. <u>substrat</u> : maltose		
- pH 4	4,6 (>2,3)	
- pH 6,5	6 (>4,4)	
. <u>substrat</u> : MU-glucoside		
- pH 4		0,1 (1,2)
- pH 6,5		(1,25) (2,2)

II.2.3.6 Patient n° 6

II.2.3.5.1 Etude microscopique (muscle jambier antérieur)

- étude en microscopie optique et histochimie

A l'examen histologique, l'aspect observé est en faveur d'un processus myogène.

- étude en microscopie électronique

En microscopie électronique, on note la présence de vésicules arrondies limitées par une membrane-unité, et emplies uniformément de grains glycogéniques très serrés : ce sont des lysosomes thésaurisateurs. Au voisinage des mitochondries, il existe parfois une accumulation de lipides.

Il n'y a pas de véritable autophagie.

II.2.3.6.2 Etude biochimique

La cholestérolémie est très élevée (3,5 g/l).

L'activité des transaminases (ASAT : 58 U/l, ALAT : 64 U/l) et de la créatine-kinase (CK = 92 U/l) est légèrement augmentée.

Muscle :

L'étude enzymatique du tissu musculaire révèle une absence totale d'activité de l' α -1,4-glucosidase mesurée à pH 4 (Tableau XXIV).

TABLEAU XXIV - RESULTATS DES ETUDES BIOCHIMIQUES EFFECTUEES SUR UNE BIOPSIE MUSCULAIRE DU PATIENT N°6

Glycogène g%	α -1,4-glucosidase (pH4) substrat : maltose	Phosphorylase	
		+ AMP	- AMP
0,9 (< 1,55)	0 (> 0,037)	44	5,5
		:	:
		:	:
		(> 33)	(20)

Leucocytes et fibroblastes :

L'étude enzymatique des leucocytes a été effectuée chez plusieurs membres de la famille du patient n° 6 (tableau XXV)

TABEAU XXV - RESULTATS DES DETERMINATIONS DE L'ACTIVITE
DE L' α -1,4-GLUCOSIDASE ACIDE DANS LES
LEUCOCYTES DU PATIENT N°6 ET DANS CEUX DE
QUELQUES MEMBRES DE LA FAMILLE.

	Patient n°6	Patient n°7	Frère 1	Frère 2	Oncle
Activité de l' α -1,4-glucosidase . substrat :maltose					
- pH 4	6 (> 2,3)	6,2	3,0	4	4,3
- pH 6,5	8,9 (> 4,4)	7,5	3,7	6,2	6,5

Dans les *fibroblastes*, aucune activité maltasique n'a pu être détectée vis-à-vis du substrat MU-glucoside.

L'activité enzymatique mesurée à pH 6,5 est normale, (0,92 mU/mg de protéines, pour un témoin à 1,04 mU/mg).

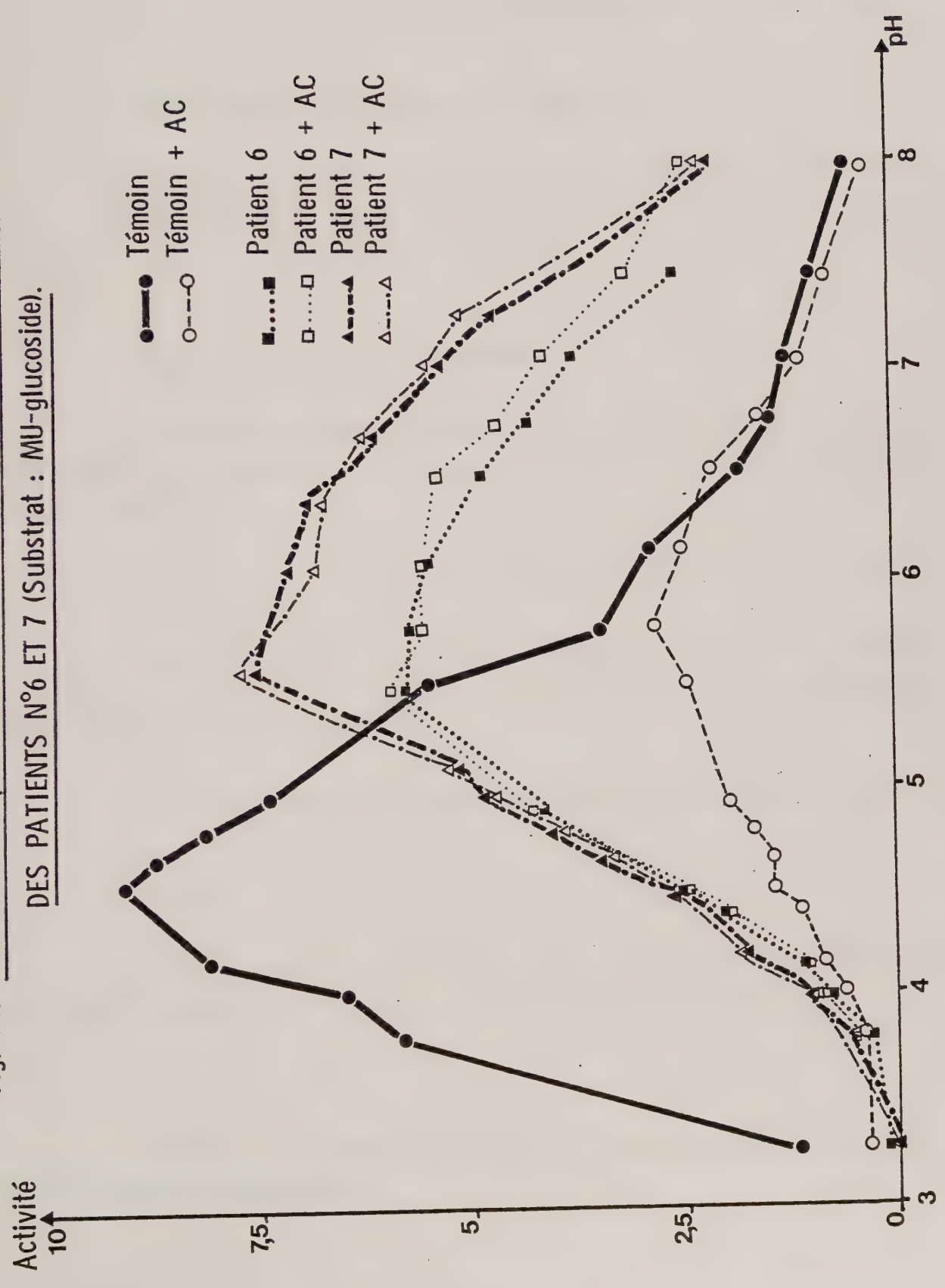
Urines :

L'influence du pH sur l'activité de l'enzyme urinaire a été étudiée chez le patient n°6 comparativement à un témoin (Fig. 30). Le pic d'activité à pH acide a disparu chez le malade et le pH optimum se situe à un pH voisin de 5,6.

Les anticorps antimaltase acide n'ont aucune action sur l'activité maltasique urinaire chez le patient.

Comme pour le malade n°2, on observe une inhibition de l'activité enzymatique en présence de KCl (Fig.23).

Fig. 30. INFLUENCE DU pH SUR L'ACTIVITE DE L' α -1, 4-GLUCOSIDASE URINAIRE
DES PATIENTS N°6 ET 7 (Substrat : MU-glucoside).



II.2.3.7 Patient n°7

II.2.3.7.1 Etude microscopique (quadriceps)

- étude en microscopie optique et histologie

L'étude en microscopie optique est frappante ; elle montre l'existence d'une "myopathie vacuolaire", généralisée avec la présence d'innombrables vacuoles optiquement vides ou occupées par un matériel granuleux basophile avec les colorations standards.

- étude en microscopie électronique

La présence de lysosomes thésaurisateurs est confirmée. La tendance autophagique est très nette, et des aspects de fibres "criblées" sont fréquemment rencontrés.

II.2.3.7.2 Etude biochimique

L'étude biochimique de cette patiente n'est que partielle; en effet, il ne nous a pas été possible de réaliser un bilan complet en raison du refus de la patiente pour l'hospitalisation.

La malade est porteuse d'une hypercholestérolémie à sérum clair.

Muscle :

La faible quantité de prélèvement nous a permis de réaliser seulement le dosage du glycogène dont le taux a été trouvé normal (0,9 g%).

Leucocytes :

Le résultat du dosage de l'activité maltasique acide leucocytaire à pH 4 est normal. (tableau XXV).

Urines :

Les résultats des études de l'influence du pH (fig. 30) des anticorps antimaltase acide (fig. 30) ou du KCl (Fig. 23) sur l'activité enzymatique urinaire sont comparables à ceux du patient n° 6 et mettent en évidence le déficit en α -1,4-glucosidase acide lysosomiale.

CHAPITRE III

DISCUSSIONIII.1. METHODOLOGIE :III.1.1. Méthodes d'étude de l' α -1,4-glucosidase acide :III.1.1.1. Mesure de l'activité enzymatique :

Dans notre étude, nous avons testé uniquement l'*activité hydrolytique* de l'enzyme sur des substrats de faible poids moléculaire. Deux substrats ont été utilisés : le substrat naturel *maltose* (103) et un substrat synthétique le *MU-glucoside* (65). La technique au MU-glucoside a été préférée lors de la purification de l'enzyme ; en effet, cette technique est plus sensible et plus facile d'emploi lorsqu'un grand nombre de dosages sont à effectuer.

Nous n'avons pas employé de technique radioactive basée sur l'hydrolyse de $[U-^{14}C]$ -*maltose* en $[U-^{14}C]$ glucose (175). Ces techniques peuvent être miniaturisées et sont intéressantes pour mesurer l'activité enzymatique des cellules amniotiques en culture (175).

Les activités *gluco-amy lasique* et *transférasique* n'ont pas été étudiées bien que la détermination du pouvoir transférasique de l'enzyme puisse apporter des éléments utiles ; en effet, comme l'ont montré HERS et VAN HOOFF (104) et de BARSY (52), il peut exister chez certains malades une dissociation entre l'activité transférasique qui est abaissée et la fonction hydrolytique de l'enzyme qui est conservée.

Notre travail nous a conduit à insister sur quelques points indispensables à une bonne interprétation des résultats :

1°) L'activité enzymatique que l'on mesure à pH 4 dans de nombreux tissus et milieux biologiques n'est pas due uniquement à l'activité de l' α -1,4-glucosidase acide lysosomiale. Les leucocytes et les urines en sont une belle illustration puisque, dans les premiers, la maltase dite "neutre" possède une activité non négligeable à pH 4 et que, dans les urines, l'isoenzyme rénale non lysosomiale est également active à ce pH. Il est donc préférable, à notre avis, de parler d'*activité maltasique mesurée à pH 4* plutôt que d'activité maltasique

acide ; de cette manière, on ne préjuge pas de la nature des enzymes ou isoenzymes responsables de l'activité maltasique à pH 4. Cette remarque est applicable à la mesure de l'activité de l' α -1,4-glucosidase évaluée à pH 6,5.

2°) Pour pouvoir comparer les résultats des déterminations enzymatiques, il convient de définir très précisément les conditions opératoires : substrat utilisé, concentration en substrat, pH du milieu réactionnel, nature du tampon et sa molarité, concentration en protéines dans le milieu réactionnel. La standardisation des techniques devient impérative lorsqu'il s'agit d'effectuer des études familiales pour la recherche d'un déficit. Quand un diagnostic a été porté dans une famille à l'aide d'une méthode particulière d'étude de l'activité enzymatique, il nous paraît indispensable d'utiliser la même méthode pour la recherche d'autres cas dans la même famille et surtout pour un diagnostic prénatal.

3°) L'influence des conditions opératoires sur l'activité enzymatique mesurée dans les leucocytes, les fibroblastes ou les cellules amniotiques en culture, est particulièrement importante et mérite quelques commentaires.

Pour les *leucocytes*, la technique d'isolement utilisée (polyvinylpyrrolidone, dextran, procédé "buffy coat") conduit à séparer une population constituée d'un mélange de polynucléaires, lymphocytes, monocytes et plaquettes (qui possèdent une activité enzymatique non identique entre eux) en proportion variable selon la technique d'isolement employée.

Les résultats des activités enzymatiques mesurées dans les *fibroblastes cutanés* en culture et les *cellules amniotiques cultivées* ne peuvent être interprétés que par rapport à des souches témoins traitées dans les mêmes conditions. C'est ainsi que lors du diagnostic prénatal d'une maladie de POMPE chez une femme ayant eu antérieurement un enfant atteint, nous avons observé une grande différence entre les résultats des dosages de l' α -1,4-glucosidase que nous avons effectués dans les cellules amniotiques cultivées dans un autre laboratoire et dans des cellules cultivées dans notre laboratoire. Les chiffres obtenus avaient été les suivants :

Origine des cellules cultivées	α -1,4-glucosidase (MU-glucoside) (dans notre laboratoire) (mU/mg pts)		β -glucosidase (mU/mg pts)
	pH 4,5	pH 6,5	pH 4,2
<u>Laboratoire extérieur :</u>			
. cellules amniotiques de la patiente	0,033	4,21	0,99
. témoin cultivé dans les mêmes conditions	0,037	1,26	1,28
<u>Laboratoire de culture de cellules (M.MATHIEU)</u>			
. 4 témoins cultivés dans notre laboratoire	0,09 0,11 0,11 0,12		0,37 à 1,1

On s'aperçoit donc qu'une interprétation isolée, sans témoin cultivé dans le même laboratoire, peut conduire à des résultats erronés. Dans le cas présent, le dosage de la β -glucosidase ne peut servir de contrôle puisque cette activité était voisine dans les deux laboratoires. Les conditions de culture peuvent donc influencer différemment des activités enzymatiques lysosomiales.

III.1.1.2. Etude qualitative

Nous avons réalisé des électrophorèses sur *acétate de cellulose*. Pour la recherche du polymorphisme de l' α -glucosidase acide, le gel d'amidon serait un support mieux adapté que l'acétate de cellulose selon SWALLOW et coll.(224). Cette technique réalise, en effet, une séparation par "électrophorèse d'affinité" du fait de la présence de liaisons α -1,4-et α -1,6-glucosidiques dans l'amidon.

D'après notre expérience, la *focalisation électrique* sur gel de polyacrylamide est meilleure pour l'étude qualitative de l' α -1,4-glucosidase que l'électrophorèse sur *acétate de cellulose* : la séparation des isoenzymes est bonne et elle permet la détermination du point isoélectrique des fractions isolées.

III.1.2. Purification de l' α -1,4-glucosidase acide placentaire et propriétés de l'enzyme purifiée :

III.1.2.1. Purification de l'enzyme placentaire :

Le placenta est un matériel particulièrement adapté à la préparation d'enzyme purifiée (227). C'est un tissu riche en enzymes lysosomiales, qui est adapté à la purification d'enzymes en assez grande quantité permettant donc d'obtenir des anticorps spécifiques contre les enzymes humaines.

Le procédé de purification de l'enzyme placentaire décrit par de BARSY et coll. (54) a été appliqué avec succès.

Nos résultats sont assez différents de ceux rapportés par de BARSY (54) et QUINTART (189). En particulier, le *degré de purification* à partir de l'homogénat placentaire est plus faible dans notre expérience. Cette discordance est à relier à la nature différente des placentas utilisés pour la préparation de l'homogénat de départ. En effet, de BARSY et QUINTART emploient des placentas qui ont été traités à l'alcool pour en extraire les gamma-globulines ; les placentas qui nous servent de source enzymatique n'ont subi aucun traitement. Ceci explique que l'activité spécifique que nous mesurons dans l'homogénat est bien supérieure à celle de ces auteurs.

Malgré les divergences constatées, nous obtenons une préparation enzymatique purifiée qui possède une activité spécifique du même ordre de grandeur (3500 U/g, substrat : maltose) que celle obtenue par les auteurs belges (7300 U/g, substrat : maltose). En outre, à l'inverse de ces auteurs, l'évaluation de l'activité spécifique n'a pas été effectuée en présence d'albumine ; or, nous avons pu constater que l'enzyme purifiée était fortement activée par l'addition d'albumine. L'adjonction d'albumine au milieu réactionnel ne nous a pas semblé souhaitable car l'enzyme purifiée peut voir son comportement modifiée par l'environnement protéique comme l'ont montré récemment KOSTER et coll. (137) à propos de l'enzyme hépatique humaine purifiée. Ces auteurs ont observé une activation de 40 à 50 % de l'activité enzymatique vis-à-vis du maltose en présence d'albumine 250 μ g/ml) ; pour le glycogène, cette activation dépend beaucoup de la concentration du polysaccharide, à une concentration en glycogène de 5 mg/ml, elle est de 27 % environ et elle atteint 330 % lorsque la concentration en glycogène est de 50 mg/ml. L'action de l'albumine ne se limite pas à une stabilisation de l'enzyme, mais elle intervient également sur ses propriétés catalytiques ; le pH optimum de l'hydrolyse du

glycogène est, en effet, déplacé de pH 5 à pH 4,5 en présence d'albumine. Ce glissement du pH optimum de l'hydrolyse du glycogène vers les pH plus acides est identique à celui que nous avons signalé en présence du chlorure de potassium et appuie l'hypothèse de l'existence de deux sites catalytiques distincts pour l'hydrolyse du maltose et du glycogène.

Le rendement final de notre purification (16 %) est plus faible que celui obtenu par de BARSY (30 %). Cette baisse de rendement peut s'expliquer par le fait que nous n'avons pas ajouté de maltose au liquide d'élution après le passage des protéines.

On observe un petit pic d'activité maltasique lors de l'élution des protéines. On aurait pu penser que cette activité correspondait à l'élution de l'activité de la maltase dite "neutre" puisque celle-ci ne possède pas d'activité dextranasique et devrait être éluee en même temps que les protéines. En fait, il s'agit d'un pic de maltase acide puisque cette activité est inhibée par les anticorps spécifiques anti-maltase acide. De plus, la courbe de pH déterminée sur cette fraction présente le même optimum d'activité (pH 4,8) que l'isoenzyme placentaire purifiée. Cette élution précoce d'une activité maltasique acide pourrait s'expliquer par une interaction de certaines molécules enzymatiques avec les protéines.

La pureté de notre préparation finale est assez bonne, elle est peu contaminée par d'autres enzymes lysosomiales. La contamination la plus importante (5 %) est celle de la N-acétyl- β -D-glucosaminidase. Nous n'avons pas poursuivi l'élimination de cette enzyme. Dans la mesure où elle pourrait interférer dans nos expériences, nous envisagerions de l'éliminer par chromatographie d'affinité.

III.1.2.2. Propriétés de l'enzyme purifiée :

Les propriétés de l'enzyme placentaire que nous avons purifiée sont très proches de celles décrites par de BARSY (54) et QUINTART (189) : point isoélectrique, K_m , absence d'inhibition par de fortes concentrations en maltose et MU-glucoside, thermostabilité, inhibition par le turanose 0,1 M.

Cependant, le pH optimum d'activité de l'enzyme vis-à-vis de l'hydrolyse d'un substrat de faible poids moléculaire (MU-glucoside) est nettement plus alcalin (4,8) que celui rapporté par de BARSY et coll. (pH 4) (54) pour l'hydrolyse d'un autre substrat de petite taille (le maltose). Ces résultats

sont tout à fait en accord avec ceux de MURRAY et coll. (172) qui, pour l'enzyme de foie humain purifiée, trouvent un pH optimum de 4,8 vis-à-vis du MU-glucoside et de 4 vis-à-vis du maltose.

Le *pouvoir immunogénique* de la préparation d'enzyme purifiée est élevé puisque les deux lapins que nous avons immunisés ont répondu, que l'antigène ait été administré par voie intramusculaire ou intraveineuse, et l'un d'entre eux nous a permis de préparer un antisérum anti-maltase acide de titre assez élevé (32). Les anticorps ne possédant pas de spécificité d'organe, nous disposons d'un anticorps adapté à l'étude de la maltase acide lysosomiale des différents tissus et milieux biologiques de l'organisme humain.

III.2. ETUDE DES PATIENTS :

III.2.1. Fréquence de la glycogénose de type II :

La *fréquence relative* de la glycogénose de type II par rapport aux autres glycogénoses étudiées au cours des dix dernières années dans notre laboratoire par M. MATHIEU se situe à 9,3 %. Ce chiffre est faible si on le compare à la fréquence déterminée par H.G. HERS et F. van HOOFF (14,9 %).

Notre fréquence ne peut être rattachée à une unité ethnique ou géographique particulière. Outre quelques malades originaires de pays limitrophes (SUISSE-ESPAGNE), la majorité des autres sujets proviennent de la région RHONE-ALPES, mais ne présentent pas cependant d'homogénéité ethnique : on trouve un pourcentage important de malades d'origine Nord-Africaine.

III.2.2. Valeurs les plus fréquentes du glycogène et des enzymes de la glycogénolyse dans notre laboratoire :

Les valeurs les plus fréquentes que nous avons rapportées sont comparables à celles du laboratoire des Pr HERS et van HOOFF à l'exception de l'amylo-1,6-glucosidase mesurée dans le sens de l'incorporation du ^{14}C - glucose au glycogène qui est légèrement différente.

III.2.3. Le ou (les)phénotypes(s) de la glycogénose de type II :

Les malades que nous avons étudiés nous paraissent représentatifs des types de glycogénose de type II que l'on peut rencontrer. Il est donc intéressant

d'examiner ces résultats par rapport à ceux décrits dans la littérature pour comparer les phénotypes de ces patients en fonction de l'âge d'apparition des premières manifestations pathologiques.

III.2.3.1. Etude clinique :

La *maladie de Pompe classique* est caractérisée essentiellement par une cardiomégalie et une hypotonie musculaire. L'hépatomégalie est très fréquente, mais peut être discrète; elle n'est pas retrouvée chez notre patient n° 1. La macroglossie est souvent décrite.

Dans les *formes juvéniles* (25 cas dans la littérature) de glycogénose de type II, l'hypotonie musculaire est constante ; elle est peu prononcée chez nos deux patients (patients n° 2 et 3). La viscéromégalie est beaucoup plus rare que dans la maladie de POMPE : deux sujets présentant une cardiomégalie sont rapportés, l'hépatomégalie est signalée cinq fois. La protrusion de la langue est notée à deux reprises.

Les *formes de l'adulte* (43 cas décrits) se présentent essentiellement comme des pseudomyopathies évoluant très lentement. L'atteinte musculaire est surtout nette au niveau des ceintures pelviennes et scapulaires (nos malades), les troubles respiratoires souvent prédominent (neuf fois dans la littérature, notre patient 6). La cardiomégalie est exceptionnelle (un cas) et l'hépatomégalie rare (deux cas, notre patient n° 6).

III.2.3.2. Etude microscopique et histologique :

Les lésions sont plus importantes dans la *maladie de POMPE* que dans les *formes juvéniles*.

Dans les *formes atypiques de l'adulte*, l'aspect observé au microscope optique ou électronique est très *variable* et comme nous l'avons déjà signalé des aspects normaux peuvent être observés à côté de lésions très nettes.

III.2.3.3. Etude biochimique

III.2.3.3.1. *L'hypercholestérolémie*

La survenue d'une hypercholestérolémie chez les malades porteurs de formes atypiques de glycogénose de type II est assez fréquente (9 cas sur les 15 cas où le cholestérol a été dosé, nos patients 6 et 7). Nous n'y voyons pas d'explication évidente.

III.2.3.3.2. *Le glycogène*

L'accumulation du glycogène dans le muscle est constante et très importante dans la *maladie de POMPE*.

Dans les *formes atypiques de glycogénose de type II*, le taux du glycogène est très variable : il peut atteindre des taux comparables à ceux observés dans la forme infantile, mais il n'est pas rare que les résultats du dosage du polysaccharide soient normaux (20 cas dans la littérature dont nos patients 4, 5 ; nos cas 6 et 7). En étudiant les données de la littérature, il apparaît cependant que les taux de glycogène musculaire les plus élevés sont plus fréquemment rencontrés dans les formes juvéniles que dans les formes de l'adulte ; inversement, les formes de l'adulte présentent plus souvent (15 fois dont nos patients 4 et 5 ; nos cas 6 et 7) un contenu en glycogène musculaire normal que les formes infantiles (4 fois).

C'est essentiellement dans les formes juvéniles que l'on rencontre un glycogène de *structure anormale* avec des chaînes externes plus courtes (4 cas juvéniles pour un cas de l'adulte).

Les résultats des dosages de glycogène hépatique étant peu nombreux, il est difficile d'en tirer des conclusions précises.

III.2.3.3.3. *L' α -1,4-glucosidase acide*

Dans la forme typique *infantile*, le déficit de l' α -1,4-glucosidase acide est profond et généralisé ; très souvent l'absence complète d'activité enzymatique est rapportée.

Dans les formes atypiques de glycogénose de type II, l'activité de l' α -1,4-glucosidase mesurée dans le muscle vis-à-vis de l'hydrolyse du maltose est très abaissée mais, en général, présente. Les 8 cas où cette activité n'est pas décelable correspondent à des formes juvéniles de la maladie. La même remarque peut être faite à partir des cinq observations (dont notre patient n° 2) où l'activité de la maltase acide déterminée dans le foie n'a pas été mise en évidence. La dissociation entre les pouvoir hydrolytique et transférasique de l'enzyme a été rapportée trois fois dans la littérature chez des sujets jeunes (4 ans, 10 ans et 13 ans). de BARSY (54) a proposé une corrélation entre le déficit de l'activité transférasique et la présence de glycogène de structure anormale. La maltase acide jouerait alors dans les lysosomes le rôle de l'amylo-1,6-glucosidase dans le cytosol.

Il ne semble pas exister de relation étroite entre l'importance du déficit enzymatique et l'expression clinique de la maladie, de même qu'entre ce déficit et l'accumulation du glycogène dans l'organisme.

Peut-on établir un phénotype distinct entre les formes infantile, juvénile et de l'adulte dans la glycogénose de type II ?

La très grande variabilité des aspects cliniques, morphologiques et biochimiques observés rend la réponse à cette question difficile. Néanmoins, quelques éléments peuvent être discutés.

L'atteinte musculaire sur le plan clinique et le déficit en α -1,4-glucosidase acide sur le plan biochimique constituent les points communs entre ces trois formes de l'affection.

La forme infantile présente quelques particularités par rapport aux deux autres formes :

- âge d'apparition de la maladie : période néonatale
- survie inférieure à 2 ans
- étude clinique : cardiomégalie, hypotonie musculaire extrême, fréquence de l'hépatomégalie
- étude morphologique : lésions constantes et intenses
- étude biochimique : accumulation du glycogène très importante, déficit profond et généralisé de l' α -1,4-glucosidase.

La différence entre les phénotypes des deux formes atypiques n'est pas évidente. Cependant, il semble que plus les sujets atteints de forme atypique de glycogénose de type II sont âgés, moins l'expression viscérale de la maladie est marquée et chez l'adulte, le tableau clinique est dominé par l'atteinte musculaire qui peut être, néanmoins, très sévère. Cette tendance évolutive pourrait s'observer chez un même sujet. Ainsi, chez notre patient n° 2 qui présentait une hépatosplénomégalie très importante, lors de la découverte de l'affection (3 ans et demi), nous avons observé une disparition de la splénomégalie et une régression de l'hépatomégalie. Par contre, l'atteinte musculaire à l'âge de 7 ans persiste.

Sur le plan morphologique, la diminution de l'intensité des lésions histologiques avec l'âge est souvent constatée.

En ce qui concerne les études biochimiques, l'accumulation du glycogène paraît plus forte dans la forme juvénile que dans celle de l'adulte. De même, le déficit en α -1,4-glucosidase est plus prononcé dans la forme juvénile.

Ces constatations doivent, évidemment, être très nuancées du fait de l'hétérogénéité qui caractérise les formes atypiques de glycogénose de type II.

Cependant, le polymorphisme de la maltase acide existe puisque SWALLOW et coll. (224) ont mis en évidence, par électrophorèse en gel d'amidon, à partir de 1691 extraits placentaires, les trois phénotypes 1, 2-1 et 2. Le type 1 est le plus fréquent, un individu sur seize est hétérozygote 2-1, le phénotype 2 est exceptionnel. Ces phénotypes seraient déterminés par deux allèles α -GLU¹ et α -GLU² sur un gène autosomique. La fréquence de l'allèle α -GLU¹ chez les Européens serait de 0,97 et de 0,03 pour l'allèle α -GLU².

Mais, jusqu'à présent, aucun argument, tant clinique qu'enzymatique, ne permet d'étayer véritablement l'hypothèse d'une hétérogénéité phénotypique entre forme juvénile et forme de l'adulte.

III.2.4. Pathogénie des formes atypiques de glycogénose de type II

Il est difficile d'expliquer pourquoi un déficit enzymatique si profond s'exprime aussi tardivement et de manière aussi hétérogène dans l'organisme. Différentes hypothèses peuvent être avancées :

- l'activité de l' α -1,4-glucosidase acide résiduelle présente dans le muscle ou constatée par la culture de fibroblastes cutanés dont l'activité enzymatique peut atteindre 20 %, pourrait limiter l'accumulation du glycogène. Mais, comment expliquer alors que certains muscles soient touchés à des degrés différents malgré une même intensité du déficit enzymatique ou que le tissu cardiaque qui possède très peu d'activité enzymatique ne soit pas infiltré par du glycogène.
- l'intervention de la maltase neutre a été proposée par ANGELINI et ENGEL (1). D'après ces auteurs, cette enzyme aurait une activité normale chez les adultes et diminuée chez les sujets plus jeunes. L'intervention de la maltase neutre suppose que celle-ci soit suffisamment active à pH acide pour dégrader le glycogène et surtout qu'elle puisse pénétrer dans les lysosomes ; ceci est peu probable et est en contradiction avec les expériences de ces mêmes auteurs (2) qui ont montré que la fraction lysosomiale isolée à partir de tissus musculaires d'adultes ne renfermait pas de maltase neutre.

III.2.5. Etude génétique de la glycogénose de type II

Comme pour la maladie de POMPE, un mode de transmission autosomal récessif peut être proposé pour les formes atypiques de glycogénose de type II :

- le caractère familial de l'affection est fréquemment retrouvé, en particulier de nombreuses observations concernent une même fratrie (littérature, nos patients 2 et 3 ; nos patients 6 et 7).
- il est possible de détecter des sujets hétérozygotes par l'étude de l'activité de la maltase acide dans les muscles (73) ou les urines (218). Chez ces sujets, l'activité enzymatique est sensiblement égale à la moitié des valeurs les plus fréquentes obtenues chez les témoins.
- Les expériences d'ASKANAS et coll. (5) ont montré que des cellules musculaires cultivées, après avoir été prélevées chez un sujet atteint d'un déficit de l'adulte, développaient très rapidement (une à quatre semaines) les mêmes lésions morphologiques et biochimiques que celles observées par examen des biopsies musculaires du sujet.

Le développement aussi rapide des lésions *in vitro* est néanmoins surprenant. D'après ASKANAS et coll.(5), un mécanisme régulateur pourrait intervenir *in vivo* dans le muscle innervé ou, *in vitro*, le muscle pourrait être affecté par la forte concentration en glucose du milieu de culture (600 mg/100ml).

Jusqu'à présent, il n'avait jamais été rapporté dans la même famille de forme infantile et de forme atypique de glycogénose de type II. Une homochronie dans l'expression de l'affection était observée. Il semblait donc que ces deux formes du déficit en α -1,4-glucosidase acide avaient une origine génétique différente.

Or, très récemment, KOSTER et coll.(141) viennent de décrire un cas de forme infantile et un cas de forme de l'adulte dans une même famille (une petite fille et son grand-père de 55 ans). Cette association peut être fortuite, mais les récents travaux de REUSER et coll.(190) viennent appuyer la possibilité d'une parenté génétique entre les deux formes. En réalisant des expériences de complémentation par fusion de fibroblastes provenant de sujets atteints de forme infantile, juvénile ou adulte, ces auteurs n'ont pas montré d'hétérogénéité génétique entre ces trois formes. REUSER et coll. (190) pensent que le déficit en maltase acide serait causé par une mutation qui affecterait la production ou la dégradation de l'enzyme plutôt que ses propriétés catalytiques. Nos expériences sur l'activation par les corticoïdes de la synthèse de l'enzyme dans les fibroblastes de formes atypiques en culture (patient n° 2) pourraient être interprétées dans le sens d'une atteinte d'un gène de régulation. Néanmoins, ces études n'ont porté que sur un malade et demandent à être confirmées.

En résumé, l'étude de nos cas, confrontée à l'analyse des 68 cas de formes juvénile et adulte rapportées dans la littérature, montre que les différentes formes de glycogénose de type II présentent :

- certaines atteintes organiques identiques
- un caractère héréditaire
- une transmission autosomique récessive avec une légère prédominance du sexe masculin (environ 60 % pour la forme classique et pour les formes atypiques)

- des aspects morphologiques comparables
- une même atteinte de l'enzyme responsable mais apparemment à des degrés divers : absence totale ou diminution de la maltase acide qui présente cependant les mêmes propriétés catalytiques que l'enzyme normale.

III.3. CONTRIBUTION AU DIAGNOSTIC DES FORMES ATYPIQUES DE GLYCOGENOSE DE TYPE II

Pour conclure cette discussion, nous voudrions insister sur quelques points particuliers de notre travail.

III.3.1. Influence des ions phosphate sur l'activité de l' α -1,4-glucosidase acide placentaire purifiée

La figure 16 montre les résultats de l'influence du chlorure de sodium, du chlorure de potassium, du dihydrogénophosphate de potassium et du dihydrogénophosphate de sodium sur l'activité de l' α -1,4-glucosidase placentaire purifiée (substrat : MU-Glucoside). Comme nous l'avons rapporté dans le chapitre "Résultats", on observe une activation de l'enzyme par le chlorure de potassium, le phosphate diacide de potassium et le phosphate diacide de sodium. L'activation par le chlorure de potassium est bien connue puisqu'elle a été décrite en 1970 par JEFFREY et coll.(125), puis par PALMER (183). JEFFREY et coll.(125) relient cette activation à la présence des ions potassium plutôt qu'à celle des ions chlorures et des anions en général. La stimulation par le phosphate diacide de potassium que nous observons n'est donc pas étonnante. Plus surprenante est l'activation par le phosphate diacide de sodium. En effet, le chlorure de sodium n'étant pas activateur (et même légèrement inhibiteur), il faut admettre que les *ions phosphates ont un effet activateur propre* sur l' α -1,4-glucosidase acide placentaire. Cet effet des ions phosphates, jamais décrit à notre connaissance, est moins marqué que celui du chlorure de potassium aux faibles concentrations en sel, mais il peut atteindre la même intensité à des concentrations 0,1 M à 0,2 M.

Bien que ces résultats ne soient que partiels, il nous a semblé intéressant de les rapporter ; il est dans notre intention de préciser le mécanisme d'activation par le phosphate et, en particulier, de l'étudier avec le substrat glycogène afin de voir si l'on observe, comme pour le chlorure de

potassium, un glissement du pH optimum vers les valeurs plus acides en présence d'ions phosphates. La comparaison de l'hydrolyse de substrats de faible poids moléculaire et de l'hydrolyse du glycogène pourrait apporter des renseignements utiles sur les sites de fixation du substrat sur l'enzyme.

L'activité de la maltase acide peut donc être augmentée par les anions contrairement à ce que pensent JEFFREY et coll. (125). Seul PALMER estimait que l'influence de l'anion pouvait ne pas être négligeable.

III.3.2. Diagnostic des formes atypiques de glycogénose de type II

Le diagnostic biochimique d'une affection doit se faire par des méthodes possédant trois qualités essentielles :

- être la plus spécifique possible
- pouvoir être effectuée sur des prélèvements faciles à obtenir
- être simple à réaliser sur le plan méthodologique

Pour l'amélioration de la spécificité des méthodes, l'utilisation d'anticorps antimaltase acide humaine est d'un apport précieux et, l'emploi des urines pour le diagnostic répond aux deux autres critères.

III.3.2.1. Intérêt des anticorps antimaltase acide humaine dans le diagnostic de la glycogénose de type II

III.3.2.1.1. Recherche de protéines réagissant avec les anticorps spécifiques antimaltase acide dans les tissus de sujets atteints de maladie de Pompe typique :

Dans les tissus de malades atteints de maladie de Pompe typique ne présentant pas d'activité enzymatique décelable, il est intéressant de savoir s'il est possible de mettre en évidence une protéine qui, bien qu'ayant perdu les propriétés catalytiques de la maltase acide, ait conservé les propriétés antigéniques

de l'enzyme normale.

Cette recherche peut être effectuée par la technique de "consommation des anticorps" comme nous l'avons décrite dans le tableau XV. Cependant, les résultats que nous avons obtenus chez notre patient n° 1 sont difficiles à interpréter. En effet, l'addition de l'enzyme placentaire purifiée aux homogénats hépatiques ou cardiaques (témoin ou malade) conduit à une activité enzymatique très nettement supérieure à la somme des activités de l'enzyme purifiée et de celle de l'homogénat hépatique ou cardiaque. Tout se passe comme s'il existait un "facteur" modifiant l'activité enzymatique de l'enzyme placentaire dans les homogénats hépatiques ou cardiaques ajoutés. L'action des protéines, dont on a signalé l'influence précédemment, peut être un élément de réponse, mais elle n'est certainement pas la seule explication. Il ne nous est donc pas possible de conclure à la présence ou non d'une protéine ayant les propriétés immunologiques de la maltase acide dans les tissus de notre patient n° 1. On constate, néanmoins, que le comportement d'un homogénat de foie normal inactivé à pH 6,5 est comparable à celui du foie de notre malade. Mais, nous ne pouvons pas non plus conclure à la disparition des propriétés antigéniques de cette préparation.

III.3.2.2. Apport de spécificité aux dosages dans les tissus et milieux biologiques

Nous illustrerons ce point avec l'étude de l' α -1,4-glucosidase leucocytaire. La mesure de l'activité de l' α -1,4-glucosidase leucocytaire à pH 4 n'a que très peu d'intérêt dans le diagnostic des formes atypiques de glycogénose de type II ; en effet, l'activité mesurée est souvent dans les limites des valeurs les plus fréquentes du fait de la présence d'enzymes d'origine non lysosomiale actives à pH 4. de BARSY (53) a montré qu'après addition d'anticorps antimaltase acide, l'activité enzymatique est fortement abaissée dans les leucocytes des sujets normaux (inhibition de l'enzyme lysosomiale) alors que dans les formes atypiques de glycogénose de type II, l'activité enzymatique demeure inchangée après addition d'anticorps du fait du déficit en maltase lysosomiale. Grâce à l'emploi des anticorps, les leucocytes deviennent alors un excellent matériel biologique, facile à prélever, pour le diagnostic des formes atypiques de glycogénose de type II.

Nous utilisons cette technique dans notre laboratoire, mais nous n'avons pas encore eu l'occasion d'étudier de formes atypiques de glycogénose

de type II. Chez les témoins, nous observons une inhibition de l'activité maltasique de l'ordre de 60 % après addition d'anticorps spécifiques. Nous utilisons la technique décrite dans le chapitre "Matériel et Méthodes"; pour étudier l'inhibition de l' α -1,4-glucosidase leucocytaire d'origine lysosomiale, 10 μ l d'anticorps spécifiques sont ajoutés au milieu réactionnel.

III.3.3. Intérêt des urines dans le diagnostic des formes atypiques de glycogénose de type II : proposition d'un test diagnostique simple.

Les urines constituent le matériel biologique le plus aisé à recueillir. Malheureusement, l'étude de la maltase acide lysosomiale urinaire est gênée par la présence d'une isoenzyme non lysosomiale d'origine rénale active à pH 4.

Nous avons étudié l'influence du pH sur l'activité maltasique urinaire chez des sujets témoins (substrat : MU-Glucoside). Un pic dont le maximum se situe à 4,5 (figure 22, figure 30) est observé. Chez les malades (nos patients n° 2, 6 et 7), on observe un pic très étalé dont le pH optimum est situé à 5,8 environ et une faible activité résiduelle à pH 4. Le diagnostic de formes atypiques de glycogénose de type II peut donc être établi mais, l'étude doit être toujours effectuée par rapport à un témoin de même âge car la proportion des différentes isoenzymes urinaires varie en fonction de l'âge des sujets.

Comme pour les leucocytes, l'utilisation d'anticorps spécifiques donne un regain d'intérêt à l'étude de la maltase acide urinaire. Chez les témoins, la fraction lysosomiale de la maltase acide urinaire est mise en évidence grâce à la diminution importante de l'activité mesurée à pH 4,5 après addition d'anticorps (figure 22, figure 30). On peut également démontrer que chez les malades, l'activité maltasique résiduelle à pH 4,5 n'est pas inhibée par les anticorps spécifiques (figure 22, figure 30). Les courbes de pH que l'on obtient chez les sujets témoins en présence d'anticorps antimaltase acide deviennent superposables à celles de sujets atteints de formes atypiques de glycogénose de type II (pH optimum : 6) (figure 22, figure 30).

L'activation de la maltase acide par le *chlorure de potassium* nous a incités à étudier l'influence de ce sel sur l'activité maltasique urinaire mesurée à pH 4,5 vis-à-vis du MU-Glucoside afin de voir si le comportement de l'enzyme urinaire était différent chez les témoins de celui constaté chez les malades. L'activité maltasique a été mesurée à pH 4,5 pour des concentrations croissantes

en chlorure de potassium. Quinze témoins et trois malades (patients n° 2, 6 et 7) ont été étudiés. Les résultats observés chez les témoins et chez les malades sont tout à fait différents.

Chez les quinze témoins, une *nette activation* de l'activité enzymatique mesurée à pH 4,5 est observée. L'activation est progressive jusqu'à une concentration 2 M où la stimulation est maximale, puis elle diminue lentement. On peut penser que pour des concentrations supérieures à 2 M, l'enzyme est dénaturée par la très forte concentration en sel du milieu réactionnel. Nous avons ainsi pu établir une zone de valeurs les plus fréquentes (en pointillés sur la figure 23).

Chez les trois patients, l'influence du chlorure de potassium se traduit par une *forte inhibition* de l'activité maltasique (mesurée à pH 4,5) qui est de l'ordre de 50 % pour une concentration en chlorure de potassium égale à 2 M.

Nous avons alors étudié la spécificité des modifications de l'activité enzymatique urinaire en présence de chlorure de potassium chez les sujets témoins d'une part, et chez les patients d'autre part. Nous avons donc testé l'influence du chlorure de potassium sur l'enzyme urinaire de témoins en présence d'anticorps spécifiques antimaltase acide (substrat MU-Glucoside). Les courbes obtenues dans ces conditions, chez les témoins, montrent une inhibition de l'enzyme et elles deviennent pratiquement comparables à celles de sujets atteints de formes atypiques de glycogénose de type II (figure 23). L'étude n'a pas été poursuivie à une concentration supérieure à 2 M car une précipitation des anticorps peut se produire. L'activation par le chlorure de potassium porte donc sur la maltase acide lysosomiale et apparaît spécifique de cette enzyme. Cette spécificité devra également être envisagée sur le pouvoir glucoamylasique de l'enzyme vis-à-vis du substrat glycogène. Au contraire, l'inhibition s'exerce sur l'isoenzyme dont le pH optimum est à 6.

A partir de ces résultats, il est possible de proposer un test simple pour le diagnostic des formes atypiques de glycogénose de type II. La distinction la plus nette entre les courbes des témoins et des malades est observée pour une concentration 2 M en chlorure de potassium. Nous proposons donc de déterminer le rapport
$$\frac{\text{activité maltasique pH 4,5 + KCl 2 M}}{\text{activité maltasique pH 4,5 sans KCl}}$$
. Le milieu réactionnel est le suivant :

substrat MU-Glucoside 1 mM en chlorure de potassium 4 M.....	50	/ul
tampon acétate de sodium 0,2 M.....	50	/ul
solution de chlorure de potassium 4 M.....	50	/ul
urine à étudier.....	50	/ul

Ce rapport est compris entre 1,2 et 1,5 pour les témoins. Chez nos trois patients, ce rapport a été trouvé à 0,5. La différence entre ces rapports nous paraît assez importante pour donner un intérêt diagnostique certain à ce test. Les valeurs de ces rapports sont comparables à celles trouvées par SALAFSKY et coll. (205) lors de la détermination des rapports $\frac{\text{activité maltasique pH 4}}{\text{activité maltasique pH 6}}$ dans les urines des sujets atteints de maladie de POMPE et de témoins.

Ce test est simple à réaliser, peut se pratiquer sur une miction conservée à 4° C et ne nécessite pas de rapporter l'activité à l'élimination de la créatinine urinaire puisque l'activité mesurée à pH 4,5 en absence de KCl constitue la valeur de référence. L'activité enzymatique urinaire se conserve assez bien, les urines peuvent être adressées dans de bonnes conditions (à 4° C) à des centres spécialisés. Ce test nous semble adapté à des enquêtes réalisées soit dans des familles, soit dans des centres regroupant des malades souffrant de maladies musculaires.

Les résultats entre les témoins et les sujets atteints étant très différents, le diagnostic d'hétérozygotie devrait être possible par l'utilisation de ce test. Nous n'avons malheureusement pas eu l'occasion de pratiquer une telle recherche.

En résumé, dans notre expérience, la détermination du rapport des activités maltasiques mesurées à pH 4,5 en présence et en absence de chlorure de potassium 2 M nous paraît être un bon test diagnostique des formes atypiques de glycogénose de type II grâce à sa spécificité, sa simplicité et à sa sensibilité.

- CONCLUSION -

Nos sept cas de déficit en maltase acide nous ont amenés à faire une revue des 68 cas de formes atypiques actuellement publiées. L'analyse comparée de ces observations nous a conduit aux conclusions suivantes :

- mise à part la forme infantile classique de maladie de Pompe, il n'existe pas de différence nettement tranchée entre toutes les formes atypiques, qu'elles soient d'apparition précoce (2 à 3 ans) ou au contraire très tardive (58 ans) ; en particulier, l'expression clinique, morphologique et l'étude qualitative de l'enzyme résiduelle n'ont pas fait ressortir de caractère propre à une forme "juvénile" et une forme de l'adulte.

- De plus, la parenté génétique existant entre toutes les formes de déficit en maltase acide semble maintenant clairement établie. Récemment, la description par KOSTER et coll. (141) d'une forme infantile et d'une forme atypique de glycogénose de type II dans la même famille et les expériences de REUSER et coll. (190) par fusion de fibroblastes provenant de ces deux formes, plaident en faveur d'une relation génétique entre ces deux types de glycogénose type II.

Notre travail avait précisément pour but d'étudier la maltase acide dans plusieurs formes différentes de glycogénose de type II : maladie de Pompe, forme juvénile et forme de l'adulte. L'approche immunologique nous paraissait être une façon d'aborder la protéine; même dépourvue d'activité catalytique. C'est pourquoi, nous avons d'abord purifié l'enzyme humaine placentaire : cette purification nous a permis de multiplier par 100 l'activité spécifique par rapport au tissu de départ. Les propriétés de l'enzyme ainsi purifiée ont été étudiées :

- activité spécifique (3500 U/g, substrat maltose)
- point isoélectrique : 4,75.
- K_m : 6,7 mM (MU-Glucoside), 12,5 mM (maltose).

- pH optimum : 4,8 (MU-Glucoside).
- thermostabilité jusqu'à 50°C.
- inhibition par le turanose 0,1 M.

L'influence des ions a été précisée et, en particulier, le pouvoir d'activation des anions vis-à-vis de l'enzyme placentaire purifiée a été démontré : les ions phosphates à faible concentration activent son pouvoir hydrolytique vis-à-vis du MU-Glucoside. Cette activation apparaît, dans certaines conditions, aussi importante que celle exercée classiquement par le chlorure de potassium.

L'enzyme purifiée nous a permis d'obtenir des anticorps antimaltase acide humaine à un titre élevé (32 par la méthode d'OUCHTERLONY) après injection chez le lapin. Ces anticorps n'ont pas de spécificité d'organes, mais ils sont sans aucune action sur la maltase dite "neutre". Les anticorps nous ont permis de préciser les propriétés antigéniques de la maltase acide de différents tissus humains normaux et des sept sujets atteints de glycogénose de type II.

Enfin, nous proposons un test simple effectué dans les urines qui permet le diagnostic rapide de forme atypique de glycogénose de type II : détermination du rapport de l'activité maltasique en présence et en absence de chlorure de potassium 2 M. Chez les sujets témoins, ce rapport est compris entre 1,2 et 1,5 alors que chez les malades il est voisin de 0,5. En conclusion, si le diagnostic de la forme classique de maladie de Pompe ne pose pas de problème particulier, celui des formes atypiques pourrait bénéficier d'une méthode diagnostique simple du type de celle que nous proposons. Ce diagnostic, actuellement utile dans les enquêtes génétiques, pourrait prendre un intérêt nouveau pour la détection précoce de l'affection dans l'optique d'un traitement efficace qui reste encore à découvrir.

RESUME

Depuis la description par POMPE en 1932 du premier cas de glycogénose de type II et la découverte par HERS en 1963 du déficit enzymatique responsable (déficit en alpha-1,4-glucosidase acide ou maltase acide EC.3.2.1.20), le nombre des formes atypiques (68 cas actuellement décrits dans la littérature) liées à ce déficit n'a cessé d'augmenter.

Le présent travail rapporte les investigations biochimiques effectuées dans un cas de *maladie de POMPE* et six cas de *formes atypiques* de glycogénose de type II.

La *première partie* de cette thèse est consacrée à un rappel sur le lysosome, la maltase acide et son déficit.

Les propriétés physicochimiques, antigéniques et catalytiques de l'enzyme humaine purifiée sont décrites.

Une revue des 68 cas de formes atypiques de glycogénose de type II décrites dans la littérature est envisagée.

La *deuxième partie* rapporte notre travail personnel à propos de *sept cas* étudiés : un cas de maladie de POMPE et six cas de formes atypiques correspondant à deux formes juvéniles et quatre formes tardives de l'adulte.

Avant d'aborder l'étude enzymatique de ces cas, nous avons purifié l'enzyme humaine normale d'origine placentaire :

- ses propriétés physicochimiques (point isoélectrique, thermostabilité) ont été déterminées.
- ses propriétés enzymatiques (affinités pour le maltose et le 4-méthyl-umbelliféryl-alpha-D-glucopyranoside, influence du pH sur l'activité mesurée, influence du chlorure de potassium, du chlorure de sodium, du phosphate de sodium, du phosphate de potassium, et du pouvoir inhibiteur du turanose) ont été étudiées.

- ses propriétés immunogéniques ont été mises à profit pour préparer les anticorps spécifiques chez le lapin.

L'étude enzymatique de nos cas de glycoogénose de type II a été réalisée à l'aide de différents tissus : foie, muscle, leucocytes, fibroblastes, urines.

Dans les 6 cas de formes atypiques étudiées, présentant une activité maltasique résiduelle, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'anomalies qualitatives de l'enzyme aussi bien en ce qui concerne les propriétés enzymatiques que les propriétés antigéniques.

Nous avons mis au point un test simple pratiqué sur les urines permettant de faire le diagnostic des formes atypiques de glycogénose de type II : le rapport de l'activité maltasique urinaire déterminée en présence de chlorure de potassium 2 M sur l'activité maltasique sans chlorure de potassium est calculé. Ce rapport est nettement supérieur à 1 chez les sujets normaux, alors que chez les malades que nous avons pu étudier, ce rapport a été trouvé nettement inférieur à 1. Les urines d'une miction suffisent pour réaliser ce test qui peut être utile dans les enquêtes familiales de cas diagnostiqués ou dans la recherche étiologique de certaines myopathies de l'adulte non étiquetées.

Dans *la discussion*, nous envisageons les hypothèses permettant d'expliquer comment un même déficit enzymatique peut, soit conduire à une affection rapidement mortelle chez le nouveau-né, soit à une pseudo-myopathie évoluant lentement chez l'adulte.

S U M M A R Y

Since the description by POMPE in 1932 of the first case of type II glycogenosis and the discovery by HERS in 1963 of the enzyme deficiency found in this affection (α -1,4-glucosidase or acid maltase EC-3.2.1.20), a large number of atypical form have been described.

This work reports biochemical investigations in a case of Pompe's disease and six cases of atypical type II glycogenosis.

The first part of this thesis recalls current litterature data on lysosomes, acid maltase and its deficiency.

Physico-chemical properties of the purified human enzyme are exposed.

A review of the 68 cases of atypical type II glycogenosis described in litterature is analysed.

The second part reports the seven cases we studied : one typical infantile case and six atypical cases : two juvenile and four adult atypical forms.

For comparison, before carrying out enzymatic studies on these cases, we purified normal enzyme from human placenta.

- physico-chemical properties (isoelectric point, thermostability) were determined.

- enzymatic properties (affinity for maltose and 4-methylumbelliferyl- α -D-glucopyranoside ; pH influence on enzymatic activity, influence of natrium and potassium chloride, of natrium and potassium phosphate, inhibitory effect of Turanose) were studied.

- synthesis of specific antibodies has been induced in the rabbit.

Then, enzymatic studies have been performed in different tissues of our patients : liver, muscle, leucocytes, fibroblastes and urines.

In our six atypical cases, no qualitative abnormalities (catalytic or antigenic) of the residual acid maltase have been found.

We propose an easy test in urines for the diagnosis of atypical type II glycogenosis : ratio of urinary maltase activity (pH 4,5) determined with and without potassium chloride 2 M. This ratio is significantly above 1 in normal subjects and clearly under 1 in our cases. One urine sample is sufficient. This test can be useful in familial studies and for the differential diagnosis of adult myopathy.

In *the discussion*, we consider different temptative explanations for clinical heterogeneity of apparently the same enzymatic defect.

- B I B L I O G R A P H I E -

- 1.- ANGELINI C. et ENGEL A.G.
Comparative study of acid maltase deficiency : Biochemical differences between infantile, childhood and adult types.
Arch. Neurol. 1972, 26, 344-349.
- 2.- ANGELINI C. et ENGEL A.G.
Subcellular distribution of acid and neutral alpha-glucosidases in normal, acid maltase deficient and myophosphorylase deficient human skeletal muscle.
Arch. Biochem. Biophys. 1973, 156, 350-355.
- 3.- ANGELINI C., ENGEL A.G. et TITUS J.L.
Adult acid maltase deficiency : abnormalities in fibroblasts cultured from patients.
New. Engl. J. Med. 1972, 287, 948-951.
- 4.- APPELMANS F., WATTIAUX R. et de DUVE C.
Tissue fractionation studies. V. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver.
Biochem. J. 1955, 59, 438-445.
- 5.- ASKANAS V., ENGEL W.K., Di MAURO S., BROOKS B.R. et MEHLER M.
Adult - onset acid maltase deficiency : morphologic and biochemical abnormalities reproduced in cultured muscle.
New. Engl. J. Med. 1976, 294, 573-578.
- 6.- AURICCHIO F. et SICA V.
Dextran-gel filtration of rat liver alpha-glucosidases.
J. Chromatogr. 1967, 28, 26-29.
- 7.- AURICCHIO F. et BRUNI C.B.
Purification of an acid alpha-glucosidase by dextran-gel filtration.
Biochem. J. 1967, 105, 35-38.
- 8.- AURICCHIO F., BRUNI C.B. et SICA V.
Further purification and characterization of the acid alpha-glucosidase.
Biochem. J. 1968, 108, 161-167.
- 9.- BADOUAL J., LESTRADET H., VILDE J.L. et PLOUSSARD J.P.
Une forme atypique de glycogénose par déficit en maltase acide.
Sem. Hôp. 1967, 43, 1427-1434.
- 10.- BAKHRU-KISHORE R., DESJARDINS L. et KELLY S.
A microfluorometric assay of leucocyte alpha-1,4-glucosidase.
Clin. Chim. Acta. 1976, 73, 89-92.
- 11.- BARDIER A., MARTINEZ J., ROCHICCIOLI P. et CATHALA B.
Glycogénose généralisée avec aspect angiographique de cardiopathie obstructive.
Arch. Franç. Pédiat. 1969, 26, 873-887.

- 12.-BARRETT A.J.
Properties of lysosomal enzymes.
dans "Lysosomes in Biology and Pathology" (J.T.DINGLE et H.B.FELL Eds)
North-Holland Publ. Co. Amsterdam. 1969, 2, 245-312.
- 13.-BAUDHUIN P., HERS H.G. et LOEB H.
An electron microscopic and biochemical study of type II glycogenosis.
Lab. Invest. 1964, 13, 1139-1152.
- 14.-BEAUFAY H.
Methods for the isolation of lysosomes.
dans "Lysosomes in Biology and Pathology" (J.T.DINGLE et H.B.FELL Eds)
North-Holland Publ. Co. Amsterdam. 1969, 2, 515-546.
- 15.-BECK F. et LLOYD J.B.
Histochemistry and electron microscopy of lysosomes.
dans "Lysosomes in Biology and Pathology" (J.T.DINGLE et H.B.FELL Eds)
North-Holland Publ. Co. Amsterdam. 1969, 2, 567-599.
- 16.-BELENKI D.M. et ROSENFELD E.L.
Effect of urea on enzymatic activity and electrophoretic mobility of acid
gamma-amylase (alpha-glucosidase).
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1972, 46, 443-448.
- 17.-BELENKI D.M. et ROSENFELD E.L.
Acid alpha-glucosidase (gamma-amylase) from human liver.
Clin. Chim. Acta. 1975, 60, 397-400.
- 18.-BETHENOD M., BADINAND P., MATHIEU M., GILLY J. et PONCET J.
Glycogénose cardiaque infantile - évolution rapide.
Lyon Médical. 1969, 221, 1361-1365.
- 19.-BIENVENU J., CARRIER H., FREYCON F. et MATHIEU M.
Hétérogénéité de la glycogénose par déficit en alpha-1,4-glucosidase :
étude enzymatique dans trois familles.
Clin. Chim. Acta. 1978, 84, 277-292.
- 20.-BIENVENU J., MATHIEU M., de BARSY Th. et CARRIER H.
Acid maltase behaviour in atypical forms of Type 2 glycogenosis :
kinetic and immunological studies in different tissues.
16th Annual Meeting of the British Society for the study of Inborn
Errors of Metabolism. Bristol 12-14 juillet 1978.
- 21.-BISCHOFF G.
Zum Klinische Bild der Glykogenspeicherungskrankheit..
Z. Kinderh. 1932, 52, 722-726.
- 22.-BONINI P.A., CERIOTTI G. et FRANZINI C.
Human urinary alpha-glucosidase as an index of kidney tubular damage.
Clin. Chim. Acta. 1970, 27, 415-419.
- 23.-BORDIUK J.M., LEGATO M.J., LOVELACE R.E. et BLUMENTHAL S.
Pompe's disease. Electromyographic, electron microscopic and cardio-
vascular aspects.
Arch. Neurol. 1970, 23, 113-119.

- 24.-BOURNE E.J., CLARKE K., PRIDHAM J.B. et ROWE J.J.M.
Studies on type II glycogenosis.
Biochem. J. 1971, 121, 663-666.
- 25.-BOURNE E.J., CLARKE K., PRIDHAM J.B. et ROWE J.J.M.
Further observations on the activation of lysosomal acid alpha-glucosidase by cortisone derivatives.
Biochem. J. 1973, 132, 435-438.
- 26.-BROWN B.I. et ZELLWEGER H.
Alpha-1,4-glucosidase activity in leucocytes from the family of two brothers, who lack this enzyme in muscle.
Biochem. J. 1966, 101, 16C-18C.
- 27.-BROWN B.I. et BROWN D.H.
Glycogen-storage diseases : Types I, III, IV, V, VII and unclassified glycogenoses.
dans "Carbohydrate Metabolism and its disorders" (F.DICKENS, P.J.RANDLE et W.J. WHELAN Eds) Academic Press. N.Y. 1968, 2, 123-150.
- 28.-BROWN B.I., BROWN D.H.
The experimental production of glycogen storage in cultured human fibroblasts.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1972, 46, 1292-1298.
- 29.-BROWN B.I., BROWN D.H. et JEFFREY P.L.
Simultaneous absence of alpha-1,4-glucosidase and alpha-1,6-glucosidase activities (pH 4) in tissues of children with type II glycogen storage disease.
Biochemistry. 1970, 9, 1423-1428.
- 30.-BRUNI C.B. et PALUELLO F.M.
A biochemical and ultrastructural study of liver, muscle, heart and kidney in type II glycogenosis.
Virchows Arch. Abt. B. 1970, 4, 196-207.
- 31.-BRUNI C.B., AURICCHIO F. et COVELLI I.
Acid alpha-D-glucosidase glucohydrolase from cattle liver : isolation and properties.
J. Biol. Chem. 1969, 244, 4735-4742.
- 32.-BRUNI C.B., SICA V., AURICCHIO F. et COVELLI I.
Further kinetic and structural characterization of the lysosomal alpha-D-glucoside glucohydrolase from cattle liver.
Biochim. Biophys. Acta. 1970, 212, 470-477.
- 33.-CADDELL J.L. et WHITEMORE R.
Observations on generalized glycogenosis with emphasis on electrocardiographic changes.
Pediatrics. 1962, 29, 743-763.
- 34.-CANAL N., FRATTOLA L. et PELLEGRINI G.
Skeletal muscle glycogenosis type II : biochemical and electron microscopic investigations of one case.
Z. Neurol. 1972, 201, 98-108.

- 35.-CANAL N., SCARLATO G., FRATTOLA L., PELLEGRINI G. et CORNELIO F.
A mild form of glycogen storage disease type II : morphologic and biochemical data in one case.
dans les "Actualités de Pathologie Neuromusculaire". Paris, Expansion Scientifique. 1971, 473-479.
- 36.-CAPON B.
The mechanism of glycosidase action.
Biochimie. 1971, 53, 145-149.
- 37.-CARDIFF R.D.
A histochemical and electron microscopic study of skeletal muscle in a case of Pompe's disease (glycogenosis II).
Pediatrics. 1966, 37, 249-259.
- 38.-CARRIER H., LEBEL M., MATHIEU M., PIALAT J. et DEVIC M.
Late familial pseudo-myopathic muscular glycogenosis with alpha-1,4-glucosidase deficiency. Morphological, histoenzymological and biochemical approach.
Path. Europ. 1975, 10, 51-59.
- 39.-CARTER J. et SMITH E.E.
The substrate specificity of neutral alpha-glucosidase from rabbit muscle.
Arch. Biochem. Biophys. 1973, 155, 82-94.
- 40.-CHILDS A.W., CROSE R.F. et HENDERSON P.H.
Glycogen disease of the heart. Report of two cases occurring in siblings.
Pediatrics. 1952, 10, 208-217.
- 41.-CHOU S.M., GUTMANN L., MARTIN J.D. et KETTLER H.L.
Adult-type acid maltase deficiency : pathologic features.
Neurology. 1974, 24, 394.
- 42.-CINADER B.
Antibody specificity as a factor in enzyme-inhibitor and in the classification of inborn metabolic errors.
dans "Clinical Enzymology", 6th Int. Congr. Clin. Chem. München (Karger, Basel). 1966, 2, 57-87.
- 43.-COLLOMBEL C. et MATHIEU M.
Problèmes posés par les mesures d'activités enzymatiques dans les tissus et les cellules cultivées.
dans "Problèmes Actuels de Biochimie Appliquée". 9ème série. Masson Eds. 1977, 179-198.
- 44.-CORI G.T.
Biochemical aspects of glycogen deposition disease.
Mod. Probl. Paediat. 1957, 3, 344-358.
- 45.-COTTE J. et MATHIEU M.
Exploration du métabolisme du glycogène. Glycogénoses.
dans "Problèmes Actuels de Biochimie Appliquée". 2ème série (Masson et cie Eds). 1968, 71-106.

- 46.-COURTECUISSÉ V., ROYER P., HABIB R., MONNIER C. et DEMOS J.
Glycogénose musculaire par déficit d'alpha-1,4-glucosidase simulant
une dystrophie musculaire progressive. Etude clinique et enzymatique.
Microscopie optique et électronique.
Arch. Franç. Pédiat. 1965, 22, 1153-1164.
- 47.-COX R.P., DOUGLAS G., HUTZLER J., LYNFIELD J. et DANCIS J.
In-utero detection of Pompe's disease.
Lancet. 1970, 1, 893.
- 48.-DAEMS W.T., van GEMUND J.J., VIO P.M.A., WILLIGHAGEN R.G.J. et DEN TANDT W.R.
The use of intestinal suction-biopsy material for the study of lysosomal
storage diseases.
dans "Lysosomes and Storage diseases". (H.G. HERS et van HOOFF Eds) Acad.
Press. N.Y. London. 1973, 575-598.
- 49.-DANCIS J., HUTZLER J., LYNFIELD J. et COX R.P.
Absence of acid maltase in glycogenosis type II (Pompe's disease) in
tissue culture.
Amer. J. Dis. Child. 1969, 117, 108-111.
- 50.-DAVIES M.
The heterogeneity of lysosomes.
dans "Lysosomes in Biology and Pathology" (J.T.DINGLE et H.B.FELL Eds)
North-Holland Publ. Co. Amsterdam. 1975, 4, 305-348.
- 51.-DEAN R.T.
Multiple forms of lysosomal enzymes.
dans "Lysosomes in Biology and Pathology" (J.T.DINGLE et R.T.DEAN Eds)
North-Holland Publ. Co. Amsterdam. 1975, 4, 349-382.
- 52.-de BARSY Th.
La glycogénose type II : approche thérapeutique.
Thèse d'agrégation de l'enseignement supérieur. OYEZ Eds. Louvain.
1976. 154 pages.
- 53.-de BARSY Th. et HERS H.G.
Biochemical and ultrastructural study of leucocytes in type II glyco-
genosis.
Arch. Intern. Physiol. Biochim. 1975, 83, 954-955.
- 54.-de BARSY Th., JACQUEMIN P., DEVOS P. et HERS H.G.
Rodent and human acid alpha-glucosidase. Purification, properties and
inhibition by antibodies. Investigation in type II glycogenosis.
Eur. J. Biochem. 1972, 31, 156-165.
- 55.-de BARSY Th., JACQUEMIN P., van HOOFF F. et HERS H.G.
Enzyme replacement in Pompe's disease.
dans "Enzyme Replacement in Genetic diseases".
National Foundation Symposium, Birth defects.
Original Articles. 1973, 9, 184-190.
- 56.-de BARSY Th., van HOOFF F., ERMEL A., BRUCHER J.M. et BILLIET L.
Adult form of acid maltase deficiency : biochemical and neuropathological
study of two siblings.
Proc. VII Congr. Int. Neuropath. Budapest (Eds Elsevier, Excerpta Medica,
Amsterdam). 1975, 291-294.

- 57.-de DUVE C.
The lysosome in retrospect.
dans "Lysosomes in Biology and Pathology" (J.T.DINGLE et H.B.FELL Eds)
North-Holland Publ. Co. Amsterdam. 1969, 1, 3-40.
- 58.-de DUVE C.
Les lysosomes.
La Recherche. 1974, 5, 815-826.
- 59.-de DUVE C., PRESSMAN B.C., GIANETTO R., WATTIAUX R. et APPELMANS F.
Tissue fractionation studies VI. Intracellular distribution patterns
of enzymes in rat-liver tissue.
Biochem. J. 1955, 60, 604-617.
- 60.-Di MAURO S., ROWLAND L.P. et MELLMAN W.J.
Glycogen metabolism of human diploid fibroblast cells in culture.
I.Studies of cells from patients with glycogenosis types II, III and V.
Pediat. Res. 1973, 7, 739-744.
- 61.-Di MAURO S., MELLMAN W., OSKI F. et BAKER L.
Glycogen and hexose metabolism in fibroblasts cultures from galacto-
semic and glycogenosis type II patients.
Pediat. Res. 1969, 3, 368.
- 62.-Di MAURO S., STERN L.Z., MEHLER M., NAGLE R.B. et PAYNE C.
Adult-onset acid maltase deficiency : a post-mortem study.
Muscle and Nerve. 1978, 1, 27-36.
- 63.-DINCISOY M.Y., DINCISOY H.P., KESSLER A.D., JACKSON M.A. et SIDBURY J.B.
Generalized glycogenosis and associated endocardial fibroelastosis.
Report of 3 cases with biochemical studies.
J. Pediat. 1965, 67, 728-740.
- 64.-Di SANT'AGNESE P.A., ANDERSEN D.H. et METCALF K.M.
Glycogen storage disease of the muscles.
J. Pediat. 1962, 61, 438-442.
- 65.-Di SANT'AGNESE P.A., ANDERSEN D.H., MASON H.H. et BAUMAN W.A.
Glycogen storage disease of the heart.I.Report of two cases in siblings
with chemical and pathologic studies.
Pediatrics. 1950, 6, 402-424.
- 66.-Di SANT'AGNESE P.A., ANDERSEN D.H., MASON H.H. et BAUMAN W.A.
Glycogen storage disease of the heart.II. Critical review of the
litterature.
Pediatrics. 1950, 6, 607-624.
- 67.-DREYFUS J.C. et ALEXANDRE Y.
Electrophoretic characterization of acidic and neutral amylo-1,4-gluco-
sidase (acid maltase) in human tissues and evidence for two electropho-
retic variants in acid maltase deficiency.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1972, 48, 914-920 .
- 68.-DREYFUS J.C., PROUX D. et ALEXANDRE Y.
Molecular studies on glycogen storage diseases.
Enzyme. 1974, 18, 60-72.

- 69.-DUVILLARD P.
Les formes tardives de la glycogénose musculaire par déficit en maltase acide. A propos de deux observations.
Thèse Médecine. Lyon. 1976. 75 pages.
- 70.-EGGSTSTEIN M. et KREUZ F.H.
Vergleichende Untersuchungen zur quantitativen Eiweissbestimmung im Liquor und Eiweissarmen Lösungen.
Klin. Wochenschr. 1955, 33, 879-884.
- 71.-ELLMAN G.L.
Tissue sulfhydryl group.
Arch. Biochem. Biophys. 1959, 82, 70-77
- 72.-ENGEL A.G.
Acid maltase deficiency in adults : studies in four cases of a syndrome which may mimic muscular dystrophy or other myopathies.
Brain, 1970, 93, 599-616.
- 73.-ENGEL A.G. et GOMEZ M.R.
Acid maltase levels in muscle in heterozygous acid maltase deficiency and in non-weak and neuromuscular disease controls.
J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 1970, 33, 801-804.
- 74.-ENGEL A.G. et DALE A.J.D.
Autophagic glycogenosis of late onset with mitochondrial abnormalities : light and electron microscopic observations.
Mayo Clin. Proc. 1968, 43, 233-279.
- 75.-ENGEL A.G., GOMEZ M.R., SEYBOLD M.E. et LAMBERT E.H.
The spectrum and diagnosis of acid maltase deficiency.
Neurology. 1973, 23, 95-106.
- 76.-ERBSLOH F. et KRAMER W.
Skeletal muscle glycogenosis in adult life.
dans "Muscle Diseases" (J.N.WALTON, N.CANAL et G.SCARLATO Eds).
Excerpta Medica, Amsterdam. 1970, 609-612.
- 77.-ESCOUROLLE R., BERGER B. et POIRIER J.
Etude ultrastructurale d'une biopsie musculaire au cours d'une glycogénose type II.
Path. Europ. 1967, 2, 447-457.
- 78.-FENSOM A.H., BENSON P.F., BLUNT S., BROWN S.P. et COLTART T.M.
Amniotic cell 4-methylumbelliferyl-alpha-glucosidase activity for prenatal diagnosis of Pompe's disease.
J. Med. Gen. 1976, 13, 148-151.
- 79.-FIDZIANSKA A. et HAUSMANOWA-PETRUSEWICZ I.
Nineteen-year girl with myopathy diagnosed post-mortem as glycogen disease.
Neuropatologica Polska. VI, 3, 1968, 305-316.
- 80.-FLUHARTY A.L., SCOTT M.L., PORTER M.T., KIHARA H., WILSON M.G. et TOWNER J.W.
Acid alpha-glucosidase in amniotic fluid.
Biochem. Med. 1973, 7, 39-51.

- 81.-FRANZINI C. et BONINI P.A.
Alpha-glucosidases in human urine.
Clin. Chim. Acta. 1967, 17, 505-510.
- 82.-FUJIMORI K., HIZUKURI S. et NIKUNI Z.
Studies on acid alpha-1,4-glucosidase from bovine spleen.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1968, 32, 811-816.
- 83.-GADJOS A. et LESTRADET H.
Les glycoséoses. Enzymopathies.
Fascicule III. Masson. Paris Eds. 1971.
- 84.-GALJAARD H., MEKES M., de JOSSELIN-de-JONG J.E. et NIERMEIJER M.F.
A method for rapid prenatal diagnosis of glycogenosis II (Pompe's disease).
Clin. Chim. Acta. 1973, 49, 361-375.
- 85.-GALJAARD H., REUSER A.J.J., HEUKELS-DULLY M.J., HOOGEVEEN A., KEIJZER W.,
de WIT-VERBEEK et NIERMEIJER M.F.
Genetic heterogeneity and variation of lysosomal enzyme activities in
cultured human cells.
dans "Enzyme Therapy in Lysosomal Storage Diseases" (J.M.TAGER, G.J.M.
HOOGHWINKEL et W.Th.DAEMS) 1974. North-Holland. Publ. Co. Amsterdam, 35-51.
- 86.-GARANCIS J.C.
Type II glycogenosis. Biochemical and electron microscopic study.
Amer. J. Med. 1968, 44, 289-300.
- 87.-GAUTIER M., HABIB R., BARGETON E. et NOVAILLE J.
Les glycoséoses cardio-musculaires. Etude de deux cas.
Sem. Hôp. Paris. 1964, 40, 1025-1029.
- 88.-GILLETTE P.C., NIHILL M.R. et SINGER Don B.
Electrophysiological mechanism of the short PR interval in Pompe disease.
Amer. J. Dis. Child. 1974, 128, 622-626.
- 89.-GIRI K.V., NAGABHUSHANAM A., NIGAM V.N. et BELAVADI B.
Synthesis of oligosaccharides from maltose by rat liver.
Science. 1955, 121, 898-899.
- 90.-GLOCK G.E.
An investigation of the rates of digestion of starches and glycogen and
the bearing on the chemical constitution.II. Liver amylase.
Biochem. J. 1936, 30, 2313-2318.
- 91.-GOEBEL H.H., KOHLSCHUTTER A. et PILZ H.
Ultrastructural observations on the retina in type II glycogenosis
(Pompe's disease).
Ophtalmologica. 1978, 176, 61-68.
- 92.-GOLDSTONE A. et KOENIG H.
Lysosomal hydrolases as glycoproteins.
Life Sci. 1970, 9, 1341-1350.
- 93.-GOMORI G.
Microscopic histochemistry : principle and practice.
Chicago. University of Chicago Press. 1952, 189-198.

- 94.-GULLOTTA F., STEFAN H. et MATTERN H.
Pseudodystrophische Muskelglykogenose in Erwachsenenalter (Saure - Maltase - Mangel - Syndrom).
J. Neurol. 1976, 213, 199-216.
- 95.-GUNTHER R.
Beitrag zur Kenntnis der glycogen speicherkrankheit.
Virchows Arch. Pathol. Anat. 1939. 304, 87-96.
- 96.-GUTMANN R.
Formes myopathiques d'évolution lente de la glycogénose type II.
Thèse de Médecine n° 85. 1970. Strasbourg. 167 pages.
- 97.-HALLGREN P., HANSSON G., HENRIKSSON K.G., HAGER A., LUNDBLAD A. et SVENSSON S.
Increased excretion of a glucose-containing tetrasaccharide in the urine of a patient with glycogen storage disease type II (Pompe's disease).
Europ. J. Clin. Invest. 1974, 4, 429-433.
- 98 .-HALVORSON H. et ELLIAS L.
The purification and properties of an alpha-glucosidase of saccharomyces italicus Y 1225.
Biochim. Biophys. Acta. 1958, 30, 28-40.
- 99.-HEDRICK J.L. et SMITH A.J.
Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis.
Arch. Biochem. Biophys. 1968, 126, 155-165.
- 100.-HERNANDEZ A., MARCHESI V., GOLDRING D., KISSANE J. et HARTMANN A.F.
Cardiac glycogenosis. Hemodynamic, angiocardigraphic and electron microscopic findings. Report of a case.
J. Pediatrics. 1966, 68, 400-412.
- 101.-HERS H.G.
Alpha-glucosidase deficiency in generalized glycogen - storage disease (Pompe's disease).
Biochem. J. 1963, 86, 11-16.
- 102.-HERS H.G.
Glycogen storage disease type II.
dans "Control of Glycogen Metabolism" Ciba Found. Symp (W.J.WHELAN et M.P. CAMERON Eds). 1964, 354-365.
- 103.- HERS H.G. et van HOOFF F.
Enzymes of glycogen degradation in biopsy material.
dans "Methods in Enzymology"(NEUFELD et V.GINSBURG Eds) Acad. Press. N.Y. 1966, 8, 525-532.
- 104.-HERS H.G. et van HOOFF F.
Glycogen-storage disease : type II and type VI glycogenosis.
dans "Carbohydrate Metabolism and its disorders" (F.DICKENS, P.J. RANDLE et W.J.WHELAN Eds) Acad. Press. N.Y. 1968, p.151-160.
- 105.-HERS H.C. et van HOOFF F.
Genetic abnormalities of lysosomes.
dans "Lysosomes in Biology and Pathology" (J.T.DINGLE et H.B.FELL Eds) North-Holland Publ. Co. Amsterdam. 1969, 2, p.19-40.

- 106.-HERS H.G. et van HOOF F.
dans "Lysosomes and storage diseases" (H.G.HERS et F.van HOOF Eds)
Acad. Press. N.Y. 1973, 666 pages.
- 107.-HERS H.G. et de BARSY Th.
Type II glycogenosis (acid maltase deficiency).
dans "Lysosomes and Storage Diseases" (H.G.HERS et F. van HOOF Eds)
Acad. Press. N.Y. 1973, p.197-217.
- 108.-HICKMAN S. et NEUFELD E.F.
A hypothesis for I-cell disease : defective hydrolases that do not
enter lysosomes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1972, 49, 992-999.
- 109.-HIRSCHHORN K., NADLER H.L., WAITHE W.I., BROWN B.I. et HIRSCHHORN R.
Pompe's disease : detection of heterozygotes by lymphocytes stimulation.
Science. 1969, 166, 1632-1633.
- 110.-HUDGSON P., GARDNER-MEDWIN D., WORSFOLD M., PENNINGTON R.J.T. et WALTON J.N.
Adult myopathy from glycogen storage disease due to acid maltase deficiency.
Brain. 1968, 91, 435-461.
- 111.-HUG G.
Enzyme therapy and prenatal diagnosis in glycogenosis type II.
Amer. J. Dis. Child. 1974, 128, 607-609.
- 112.-HUG G. et SCHUBERT W.K.
Lysosomes in type II glycogenosis : changes during administration of
extract from Aspergillus niger.
J. Cell. Biol. 1967, 35, C1-C6.
- 113.-HUG G., SCHUBERT W.K. et SOUKUP S.
Prenatal diagnosis of type II glycogenosis.
Lancet. 1970, I, 1002.
- 114.-HUG G., SCHUBERT W.K. et SOUKUP S.
Ultrastructure and enzymatic deficiency of fibroblasts cultures in
type II glycogenosis.
Pediat. Res. 1971, 5, 107-112.
- 115.-HUG G., SCHUBERT W.K. et SOUKUP S.W.
Type II glycogenosis in adults.
New Engl. J. Med. 1973, 288, 216-217.
- 116.-HUGGETT A. St G. et NIXON D.A.
Enzymic determination of blood glucose.
Biochem. J. 1957, 66, 12 P.
- 117.-HUIJING F.
Glycogen metabolism and glycogen storage diseases.
Physiol. Rev. 1975, 55, 609-658.
- 118.-HUIJING F., van CREVELD S. et LOSEKOOT G.
Diagnosis of generalized glycogen storage disease (Pompe's disease).
J. Pediat. 1963, 63, 984-987.
- 119.-HULLSMAN W.C., OEI T.L. et van CREVELD S.
Phosphorylase activity in leucocytes from patients with glycogen sto-
rage disease.
Lancet. 1961, ii, 581-583.

- 120.-HURWITZ L.J., Mc CORMICK D. et ALLEN I.V.
Reduced muscle alpha-glucosidase (acid maltase) activity in hypothyroid myopathy.
Lancet. 1970,, 67-69.
- 121.-HUTSON D.H. et MANNERS D.J.
Studies on Carbohydrate metabolizing enzymes.
The hydrolysis of alpha-glucosides, including nigerose by extract of alfalfa and other higher plants.
Biochem. J. 1965, 94, 783-789.
- 122.-ISCH F., JUIF J.G., SACREZ R. et THIEBAUT F.
Glycogénose musculaire à forme myopathique par déficit en maltase acide.
Pédiatrie. 1966, 21, 71-86.
- 123.-IWANOWSKI H. et GANDRYA E.
A modified method for isolation of muscular glucoamylases.
Zesz. Nauk. Wyzs. Szkol. Roln. we Wrocl. 1968, 24, 105-114.
cités par ROSENFELD
- 124.-JACQUES P.J., THINES-SEMPOUX D., MARKINE-GORIANOFF J.P., van ROY J. et HUYBRECHTS-GODIN G.
Localization of acid dextranolytic activity within rat liver lysosomes.
Arch. Intern. Physiol. Biochim. sous presse.
- 125.-JEFFREY P.L., BROWN D.H. et BROWN B.I.
Studies of lysosomal alpha-glucosidase.I.Purification and properties of the rat liver enzyme.
Biochemistry. 1970, 9, 1403-1415.
- 126.-JEFFREY P.L., BROWN D.H. et BROWN B.I.
Studies of lysosomal alpha-glucosidase.II.Kinetics of action of the rat liver enzyme.
Biochemistry. 1970, 9, 1416-1422.
- 127.-JORAM A., FESSARD Cl., TRON Ph., de MENIBUS C.H. et DAILLY R.
Les glycogénoses de type II.
Sem. Hôp. Paris. 1974, 50, 489-495.
- 128.-JORGENSEN O.B.
Barley malt alpha-glucosidase.
Acta Chem. Scand. 1964, 18, 1975-1978.
- 129.-JORGENSEN B.B. et JORGENSEN O.B.
Inhibition of barley malt alpha-glucosidase by Tris (hydroxymethyl) aminomethane and erythritol.
Biochim. Biophys. Acta. 1967, 146, 167-172.
- 130.-KAPLAN A., FISCHER D., ACHORD D. et SLY W.
Phosphohexosyl recognition in a general characteristic of pinocytosis of lysosomal glycosidases by human fibroblasts.
J. Clin. Invest. 1977, 60, 1088-1093.
- 131.-KARPATI G., CARPENTER S., EISEN A., AUBE M. et di MAURO S.
The adult form of acid maltase (alpha-1,4-glucosidase) deficiency.
Ann. Neurol. 1977, 1, 276-280.
- 132.-KELEMEN M.V. et WHELAN W.J.
Inhibition of glucosidases and galactosidases by polyols.
Arch. Biochem. Biophys. 1966, 117, 423-428.

- 133.-KETELSEN U.P., BECKMANN R., NOLTE J. et MENZEL K.
Ergebnisse klinischer, biochemischer, lichtmikroskopischer und ultrastruktureller Untersuchungen einer kindlichen Muskelglykogenose bei zwei Brüdern und deren Schwester.
Z. Kinderheilk. 1973, 116, 23-41.
- 134.-KHAN N.A. et EATON N.R..
Purification and characterization of maltase and alpha-methyl glucosidase from yeast.
Biochim. Biophys. Acta. 1967, 146, 173-180.
- 135.-KOLMEL H.W., ASSMUS H. et SEILER D.
Myopathie bei Saure - Maltase - Mangel. Die Pompe'sche Erkrankung im Jugend - und Erwachsenenalter.
Arch. Psychiat. Nervenkt. 1974, 218, 93-106.
- 136.-KOSTER J.F.
Acid-maltase activity and hypothyroidism.
Lancet. 1970, 11, 1187.
- 137.-KOSTER J.F. et SLEE R.G.
Some properties of human liver acid alpha-glucosidase.
Biochim. Biophys. Acta, 1977, 482, 89-97.
- 138.-KOSTER J.F., SLEE R.G. et HULSMANN W.C.
The use of leucocytes as an aid in the diagnosis of a variant of glycogen storage disease type II (Pompe's disease).
Europ. J. Clin. Invest. 1972, 2, 467-471.
- 139.-KOSTER J.F., SLEE R.G. et HULSMANN W.C.
The use of leucocytes as an aid in the diagnosis of glycogen storage disease type II (Pompe's disease).
Clin. Chim. Acta. 1974, 51, 319-325.
- 140.-KOSTER J.F., SLEE R.G., HULSMANN W.C. et NIERMEIJER M.F.
The electrophoretic pattern and activities of acid and neutral maltase of cultivated fibroblasts and amniotic fluid cells from controls and patients with the variant of glycogen storage disease type II (Pompe's disease).
Clin. Chim. Acta. 1972, 40, 294-297.
- 141.-KOSTER J.F., BUSCH H.F.M., SLEE R.G. et van WEERDEN T.W.
Glycogenosis type II : The infantile and late-onset acid maltase deficiency observed in one family.
Clin. Chim. Acta. 1978, 87, 451-453.
- 142.-KOSTER J.F., SLEE R.G., van der KLEI - van MOORSEL J.M., RIETRA P.J.G.M. et LUCAS C.J.
Physico-chemical and immunological properties of acid α -glucosidase from various human tissues in relation to glycogenosis type II (Pompe's disease).
Clin. Chim. Acta. 1976, 68, 49-58.
- 143.-KRISMAN C.R.
A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine.
Anal. Biochem. 1962, 4, 17-23.
- 144.-KRIVIT W., POLGLASE W.J., GUNN F.D. et TYLER F.H.
Studies in disorder of muscle, IX glycogen storage disease primarily affecting skeletal muscle and clinically resembling amyotonia congenita.
Pediatrics. 1953, 12, 165-177.

- 145.-LARNER J.
Other glucosidases
dans "The Enzymes" (BOYER P.D., LARDY H. et MYRBACK K. eds).
New York Academic Press. 1960, 4, 369-378.
- 146.-LARNER J. et GILLESPIE R.E.
Gastrointestinal digestion of starch.II-Properties of the intestinal
carbohydrases.
J. Biol. Chem. 1956, 223, 709-725.
- 147.-LAUER R.M., MASCARINAS J., RACELA A.S., DIEHLA M. et BROWN B.I.
Administration of a mixture of fungal glucosidases to a patient with
type II glycogenosis (Pompe's disease).
Pediatrics, 1968, 42, 672-676.
- 148.-LEATHWOOD P.D. et RYMAN B.E.
Enzyme of glycogen metabolism in human skin with particular reference
to differential diagnosis of the glycogen storage diseases.
Clin. Sci. 1971, 40, 261-269.
- 149.-LEJEUNE N., THINES-SEMPOUX D.G. et HERS H.G.
Intracellular distribution and properties of rat-liver maltases.
Biochem. J. 1962, 84, 28 P.
- 150.-LEJEUNE N., THINES-SEMPOUX D. et HERS H.G.
Tissue fractionation studies-16-Intracellular distribution and properties
of α -glucosidases in rat liver.
Biochem. J. 1963, 86, 16-21.
- 151.-LESTRADET H., DESCHAMPS I. et TICHET J.
Les glycogénoses.
Ann. Biol. Clin. 1972, 30, 397-410.
- 152.-LESTRADET H., TICHET J., GUTMANN N. et MIMOUNI M.
Les glycogénoses.
Médecine Infantile. 1973, 2, 169-229.
- 153.-LIGHTMAN N.I. et SCHOOLEY R.T.
Adult-Onset acid maltase deficiency : Case report of an adult with
severe respiratory difficulty.
Chest. 1977, 72, 250-252.
- 154.-LLOYD J.B.
Cellular transport of lysosomal enzymes - An alternative hypothesis.
Biochem. J. 1977, 164, 281-282.
- 155.-LOEB H., SMULDERS J., van THIEL E., BARAN D. et van GEFFEL R.
Etude de deux cas de glycogenose généralisée avec cardiomégalie
(maladie de Pompe).
Rev. Belge Path. 1964, 30, 167-187.
- 156.-LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L.
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 1951, 193, 265-275.
- 157.-LUCK R., PLATT D., LANGE R.H. et KUNZE K.
Klinische, biochemische, morphologische und electro-physiologische
Untersuchungen bei einer kindlichen Glykogenese Typ II mit zweifachem
Enzymmangel.
Z. Kinderheilk. 1975, 120, 19-28.

- 158.-LUCY J.A.
Lysosomal membranes.
Dans "Lysosomes in biology and pathology" (J.T. DINGLE et H.B. FELL Eds).
North Holland Publ. Co Amsterdam. 1969, 2, 313-341.
- 159.-MAIRE I.
Les α -D-Mannosidases acides humaines.
Etude chez des sujets sains ou atteints de mannosidose. Application
au diagnostic prénatal.
Thèse Doctorat d'Etat en Pharmacie. LYON. 1978, 274 pages.
- 160.-MANCALL E.L., APONTE G.E. et BERRY R.G.
Pompe's disease (diffuse glycogenosis) with neuronal storage.
J. Neuropathol. Exptl. Neurol. 1965, 24, 85-96.
- 161.-MARTIN J.J. de BARSY Th. et den TANDT W.R.
Acid maltase deficiency in non identical adult twins : a morphological
and biochemical study.
J. Neurol. 1976, 213, 105-118.
- 162.-MARTIN J.J., de BARSY Th. de SCHRIJVER F., LEROY J.G., et PALLADINI G.
Acid maltase deficiency (Type II glycogenosis) : morphological and
biochemical study of a childhood phenotype.
J. Neurol. Sci. 1976, 30, 155-166.
- 163.-MARTIN R.G. et AMES B.N.
A method for determining the sedimentation behavior of enzymes :
Application to protein mixtures.
J. Biol. Chem. 1961, 236, 1372-1379.
- 164.-MATHIEU M. et COTTE J.
Problèmes biologiques posés par une maladie lysosomiale : la glycogénose
de Type II.
C. M. L. 1971, 47, 14, 1401-1409.
- 165.-MATHIEU M. et BIENVENU J.
Our experience of diagnosis and enzyme study of glycogen storage disease.
16th Annual Meeting of the SSIEM Society Bristol 12-14 Juillet 1978.
- 166.-MATHIEU M., BALTASSAT P., COLLOMBEL C. et COTTE J.
Acid alpha-glucosidase activity in different tissues from an atypical
Pompe's disease. Effects of cortisone derivatives on fibroblasts.
Fourth International conference on Birth Defects, Vienne, 2-8 Sept. 1973.
- 167.-MATSUSAKA K., CHIBA S. et SHIMOMURA T.I.
Purification and substrate specificity of Brewer's yeast α -glucosidase.
Agr. Biol. Chem. 1977, 41, 1917-1923.
- 168.-MEHLER M. et DI MAURO S.
Residual acid maltase activity in late onset acid maltase deficiency. Detection
of patients and heterozygotes by urinary enzyme assay.
Neurology. 1977, 27, 178-184.
- 169.-MEKANIK G., SMITH R.L. et MAC LEOD R.M.
Enzyme patterns in glycogen storage disease type II (Pompe's disease).
Metabolism. 1966, 15, 641-648.
- 170.-MILUNSKY A., SPIELVOGEL C. et KANFER J.N.
Lysosomal enzyme variations in cultured normal skin fibroblasts.
Life Sci. 1972, 11, 1101-1107.

- 171.-MULLER O.F., BELLET S. et ERTRUGRUL A.
Glycogen storage disease. Report of a case with generalized glycogenosis and review of the literature.
Circulation. 1961, 23, 261-268.
- 172.-MURRAY A.K., BROWN B.I. et BROWN D.H.
The molecular heterogeneity of purified human liver lysosomal α -glucosidase (Acid α -glucosidase).
Arch. Biochem. Biophys. 1978, 185, 511-524.
- 173.-NADLER H.L. et MESSINA A.M.
In-utero detection of type II glycogenosis (Pompe's disease).
Lancet. 1969, II, 1277-1278.
- 174.-NADLER H.L., BIGLEY R.H. et HUG G.
Prenatal detection of Pompe's disease.
Lancet. 1970, 2, 369.
- 175.-NELSON P.V., CAREY W.F. et POLLARD A.C.
A micro-radiochemical assay for α -1,4-glucosidase and its use in the assesment of type II glycogenosis (Pompe's disease).
Clin. Chim. Acta. 1977, 77, 337-342.
- 176.-NEUFELD E.F. et CANTZ M.
The mucopolysaccharidoses studied in cell culture Dans "Lysosomes and Storage diseases". (H.G. HERS et F. VAN HOOFF eds.)
Acad. Press. N.Y. 1973, 261-275.
- 177.-NEUFELD E.F., LIM T.W. et SHAPIRO L.J.
Inherited disorders of lysosomal metabolism.
Ann. Rev. Biochem. 1975, 367-376.
- 178.-NEVSIMAL O., KOCURA P.
Mirny pribch genekalizovane glykogenozy (Morbus Pomp) (Benign course of generalized glycogenosis).
CS. Neurol. Neurochir. 1973, 36, 174-178.
- 179.-NIERMEIJER M.F., KOSTER J.F., JAHODOVA M., FERNANDES J., HEVKELS-DULLY M.J. et GALJAARD H.
Prenatal diagnosis of type II glycogenosis (Pompe's disease) using micro-chemical analysis.
Pediat. Res. 1975, 9, 498-503.
- 180.-NIHILL M.R., WILSON D.S. et HUGH-JONES K.
Generalized glycogenosis type II (Pompe's disease).
Arch. Dis. Childhood. 1970, 45, 122-129.
- 181.-NITOWSKY H.M., GRUNFELD A.
Lysosomal α -glucosidase in type II glycogenosis : activity in leukocytes and cell cultured in relation to genotype.
J. Lab. Clin. Med. 1967 69, 472-484.
- 182.-OUCHTERLONY O.
Diffusion-in-gel methods for immunological analysis.
Prog. Allergy. 1958, 5, 1-78.
- 183.-PALMER T.N.
The substrate specificity of acid α -glucosidase from rabbit muscle.
Biochem. J. 1971, 124, 701-711.

- 184.-PALMER T.N.
The maltase, glucoamylase and transglucosylase activities of acid α -glucosidase from rabbit muscle.
Biochem.J. 1971, 124, 713-724.
- 185.-PAZUR J.H. et ANDO T.
The action of an amyloglucosidase of *Aspergillus niger* on starch and malto-oligosaccharides.
J. Biol. Chem. 1959, 234, 1966-1970.
- 186.-POMPE J.C.
Over idiopathische hypertrophie van het hart.
Ned. Tijdschr. Geneesk. 1932, 76, 304-311.
- 187.-PRALLE H., SCHRODER R. et LOFFLER H.
New kind of cytoplasmic inclusions of plasma cells in acid Maltase deficiency.
Acta. Haemat. 1975, 53, 109-117.
- 188.-PUTSCHAR W.
Über angeborene Glykogenspeicherkrankheit des Herzens "Thesaurismosis glycogenica" (von Gierke).
Z. Beitr. Path. Anat. 1932, 90, 222-232.
- 189.-QUINTART J.
Purification et propriétés de l' α -glucosidase acide humaine.
Mémoire licence, es, Sciences - Faculté Catholique LOUVAIN. 1973, 110 pages.
- 190.-REUSER A.J.J., KOSTER J.F., HOOGEVEEN A. et GALJARD H.
Biochemical, immunological, and cell genetic studies in glycogenosis Type II.
Am. J. Hum. Genet. 1978, 30, 132-143.
- 191.-REUSER A.J.J., HALLEY D., de WIT E., HOOGEVEEN A., van der KAMP M., MULDER M. et GALJAARD H.
Intercellular exchange of lysosomal enzymes : Enzyme assays in single human fibroblasts after co-cultivation.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1976, 69, 311-318.
- 192.-ROERDINK F.H., van RENSWOUDE A.J.B.M., WIELINGA B.Y., KROON A.M. et SCHERPHOF G.L.
Entrapment within liposomes facilitates uptake of amylo-glucoosidase by cultured fibroblasts from a patient with Pompe's disease (glycogenosis type II)
J. Mol. Med. 1976, 1, 257-263.
- 193.-ROSENFELD E.L.
Animal tissue γ -amylase and its role in the metabolism of glycogen. dans "Control of glycogen metabolism".
Ciba Foundation (W.J. WHELAN et M.P. CAMERON. Eds). 1964, 176-192.
- 194.-ROSENFELD E.L.
Alpha-glucosidases (gamma- amylases) in human and animal organisms.
Path. Biol. 1975, 23, 71-84.
- 195.-ROSENFELD E.L. et POPOVA I.A.
L'exopolyglucosidase (γ -Amylase) du foie.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1962, 44, 129-139.

- 196.-ROSENOW E.C. et ENGEL A.G.
Acid maltase deficiency in adults presenting as respiratory failure.
Am. J. Med. 1978, 64, 485-491.
- 197.-ROTH J.C. et WILLIAMS H.E.
The muscular variant of Pompe's disease.
J. Pediat. 1967, 71, 567-573.
- 198.-RUSSO G., PATANE R., SCHILIRO G.
Su due casi di malattia di Pompe.
Min. Ped. 1970, 23, 1543-1548.
- 199.-RYAN C.M., LEE S.Y. et NADLER H.L.
Effect of culture conditions on enzyme activities in cultivated human fibroblasts.
Exp. Cell Res. 1972, 71, 388-392.
- 200.-RYMAN B.E.
The glycogen storage diseases.
J. Clin. Path. 1975, 27, 106-121.
- 201.-SAKURAI I., TOSAKA A., MORI Y., IMURA S. et AOKI K.
Glycogenosis type II (Pompe).
The fourth autopsy case in Japan.
Acta Pathol. Jap. 1974, 24, 829-846.
- 202.-SALAFSKY I.S. et NADLER H.L.
 α -1,4-glucosidase activity in Pompe's disease.
J. Pediat. 1971, 79, 794-798.
- 203.-SALAFSKY I.S. et NADLER H.L.
Prenatal diagnosis of Pompe's disease.
New. Engl. J. Med. 1971, 284, 732.
- 204.-SALAFSKY I.S. et NADLER H.L.
A fluorometric assay of alpha-glucosidase and its application in the study of Pompe's disease.
J. Lab. Clin. Med. 1973, 81, 450-454.
- 205.-SALAFSKY I.S. et NADLER H.L.
Deficiency of acid alpha-glucosidase in the urine of patients with Pompe's disease.
J. Pediat. 1973, 82, 294-297.
- 206.-SAWANT P.L., SHIBKO S., KUMTA V.S. et TAPPEL A.L.
Isolation of rat-liver lysosomes and their general properties.
Biochim. Biophys. Acta. 1964, 85, 82-92.
- 207.-SCHAUB J., OSANG M., von BASSEWITZ D.B., GROTE W., TERINDE R., LOMBECK I. et BREMER H.J.
Pränatale Diagnose einer glykogenose Typ II (Pompe) mit nachfolgender Interruptio.
Dtsch. Med. Wschr. 1974, 99, 2219-2222.
- 208.-SCHMINCKE A
Kongenitale Herzhypertrophie bedingt durch diffuse Rhabdomyombildung.
Z. Beitr. Path. Anat. 1922, 70, 513-515.
- 209.-SCHNABEL R.
Zur Histochemie der mucopolysaccharidartigen Substanzen (basophile Substanzen) in der Skelet muskulatur bei neuromuskulärer glykogenose (Typ II).
Acta. Neuropathol. 1971, 17, 169-178.

- 210.-SEIFFERT D.
Die Congenitalen multiplen Rhabdomyome des Herzens.
Z. Beitr. Path. Anat. 1900, 27, 145-152.
- 211.-SEIFTER S., DAYTON S., NOVIS B., MUNTWYLER E.
The estimation of glycogen with the anthrone reagent.
Arch. Biochem. 1950, 25, 191-199.
- 212.-SEILER D., KELLETER R., KOLMEL H.W. et HEENE R.
 α -1,4-glucosidase activity in leucocytes and lymphocytes of 2 adult patients with glycogen storage disease type II (Pompe's disease).
Experientia. 1973, 29, 972-973.
- 213.-SEITER C.W. et SUMMER G.K.
Glycogen metabolism in human skin fibroblasts. Influence of maltose on the activity of acid α -1,4-glucosidase.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1975, 149, 945-949.
- 214.-SENGEL A., STOEGBNER P. et ISCH F.
Une myopathie vacuolaire. "La glycogenose autophagique à début tardif".
Etude ultrastructurale.
Ann. Anat. Pathol. 1971, 16, 47-54.
- 215.-SICA V., SIANI A., BRUNI C.B. et AURICCHIO F.
Maltase, isomaltase and glucoamylase activities of the acid α -D-glucoside glucohydrolase isolated from cattle liver.
Biochim. Biophys. Acta. 1971, 242, 422-427.
- 216.-SMITH H.L., AMICK L.D. et SIDBURY J.B.
Type II glycogenosis : report of a case with four year survival and absence of acid maltase associated with an abnormal glycogen.
Amer. J. dis. Child. 1966, 111, 475-481.
- 217.-SMITH J., ZELLWEGER H., AFIFI A.K.
Muscular form of glycogenosis type II (Pompe) Report of a case with unusual features.
Neurology. 1967, 17, 537-549.
- 218.-SOYAMA K., ONON E., SHIMADA N., TANAKA K. et KUSUNOKI T.
Urinary α -glucosidase analysis for the detection of the adult form of Pompe's disease.
Clin. Chim. Acta. 1977, 77, 61-67.
- 219.-SOYAMA K., ONO E., SHIMADA N., TANAKA K., OYA N. et KUSUNOKI T.
Properties of the alpha-glucosidase from various human tissues in relation to glycogenosis type II (Pompe's disease).
Clin. Chim. Acta. 1977, 78, 473-478.
- 220.-STEINITZ K. et RUTENBERG A.
Tissue α -glucosidase activity and glycogen content in patients with generalized glycogenosis.
Israel J. Med. Sci. 1967, 3, 411-421.
- 221.-STETTEN M.R.
Transglucosylation by a mammalian liver enzyme.
J. Amer. Chem. Soc. 1959, 81, 1437-1443.

- 222.-STRECKER G.
Glycoprotéines et glycoprotéinoses dans les "oligosaccharidoses".
FARRIAUX J.P. CROUAN et ROQUES Eds. 1977, 13-30.
- 223.-SWAIMAN K.F., KENNEDY W.R., et SAULS H.S.
Late infantile acid maltase deficiency.
Arch. Neurol. 1968, 18, 642-648.
- 224.-SWALLOW D.M., CORNEY G., HARRIS H. et HIRSCHHORN R.
Acid α -glucosidase : a new polymorphism in man demonstrable by
"affinity" electrophoresis.
Ann. Hum. Genet. Lond. 1975, 38, 391-406.
- 225.-TAKAHASHI N. et SHIMOMURA T.
Action of rice α -glucosidase on maltose and starch.
Agr. Biol. Chem. 1973, 37, 67-74.
- 226.-TAPPEL A.L.
Lysosomal enzymes and other components dans "Lysosomes in Biology and
Pathology" (J.T. DINGLE et H.B. FELL Eds).
North Holland Publ. Co. Amsterdam. 1969, 2, 207-244.
- 227.-THANAVALA Y.M., SHETH A.R., THAKUR A.N., RAO S.S., PURANDARE M.
Occurrence of alpha-glucosidase (maltase) in the human placenta.
Am. J. Obstet. Gynecol. 1974, 120, 285-289.
- 228.-TORRES H.N. et OLAVARRIA J.M.
Liver alpha-glucosidases.
J. Biol. Chem. 1964, 239, 2427-2434.
- 229.-TSUJISAKA Y. et FUKUMOTO J.
Nippon, Nogeikagaku Kaishi. 1963, 37, 747.
cités par YAMASAKI et coll. (245).
- 230.-VAES G.
Digestive capacity of lysosomes.
Dans "Lysosomes and storage diseases"
(H.G. HERS et F. VAN HOOFF Eds). Academic Press N.Y. 1973, 42-77.
- 231.-VAN HOLDE K.E. et BALDWIN R.L.
Rapid attainment of sedimentation equilibrium.
J. Phys. Chem. 1953, 62, 734-743.
- 232.-VAN HOOFF F.
Les mucopolysaccharidoses en tant que thésaurismoses lysosomiales.
Thèse Louvain, VANDER eds. 1972, 285 pages.
- 233.-VAN HOOFF F., HUE L., de BARSY Th., JACQUEMIN P., DEVOS P. et HERS H.G.
Glycogen storage diseases.
Biochimie. 1972, 54, 745-751.
- 234.-VIRCHOW R.
Congenitale cavernöse Myome des Herzens.
Virchow's Arch. Path. Anat. 1864, 30, 468-471.
- 235.-von FIGURA.
Acid hydrolases production, release and uptake by cultivated fibroblasts.
dans "the cultured cells and inherited metabolic diseases". (R.A. HARKNESS
et F. COCKBURN Eds).
MTP Press limited - Lancaster England - 1977, 105-119.

- 236.-WATTIAUX R., WIBO M. et BAUDHUIN P.
Influence of the injection of Triton WR-1339 on the properties of rat-liver lysosomes.
dans "Ciba Foundation symposium on lysosomes" (A.V.S. de REUCK et M.P. CAMERON, eds). 1963, 176-196.
- 237.-WHITBY L.G.
Transglucosidation Reactions with Flavins.
Biochem. J. 1954, 57, 390-396.
- 238.-WILLIAMS H.E.
 α -glucosidase activity in-human leucocytes.
Biochim. Biophys. Acta. 1966, 124, 34-38.
- 239.-WITZLEBEN C.L.
Renal Cortical tubular glycogen localization in glycogenosis type II (Pompe's disease).
Lab. Invest. 1969, 20, 424-429.
- 240.-WYSS S.R., KOSTER J.F. et HULSMANN W.C.
Choice of leucocyte preparations in the diagnosis of glycogen storage disease type II (Pompe's disease).
Clin. Chim. Acta. 1971, 35, 277-280.
- 241.-YAMASAKI Y., MIYAKE T. et SUZUKI Y.
Purification and crystallization of α -glucosidase from *Mucor javanicus*.
Agr. Biol. Chem. 1973, 37, 131-137.
- 242.-YAMASAKI Y., MIYAKE T. et SUZUKI Y.
Properties of crystalline α -glucosidase from *Mucor javanicus*.
Agr. Biol. Chem. 1973, 37, 251-259.
- 243.-YAMASAKI Y. et SUZUKI Y.
Purification and properties of α -glucosidase from *Bacillus cereus*.
Agr. Biol. Chem. 1974, 38, 443-454.
- 244.-YAMASAKI Y., SUZUKI Y. et OZAWA J.
Purification and properties of α -glucosidase from *Penicillium purpurogenium*.
Agr. Biol. Chem. 1976, 40, 669-676.
- 245.-YAMASAKI Y., SUZUKI Y. et OZAWA J.
Purification and properties of α -glucosidase from *Penicillium oxalicum*.
Agr. Biol. Chem. 1977, 41, 1451-1458.
- 246.-YAMASAKI Y. et SUZUKI Y.
Purification and properties of α -glucosidase and glucoamylase from *Lentinus edodes*.
Agr. Biol. Chem. 1978, 42, 971-980.
- 247.-ZELLWEGER H., DARK A. et ABU HAIDAR G.A.
Glycogen disease of skeletal muscle - Report of two cases and review of literature.
Pediatrics. 1955, 15, 715-732.
- 248.-ZELLWEGER H., BROWN B.I., Mc CORMICK W.F. et TU J.
A mild form of muscular glycogenosis in two brothers with α -1,4-glucosidase deficiency.
Ann. Pediat. 1965, 705, 413-437.

SIGNIFICATION DES ABREVIATIONS EMPLOYEES

AC	=	Anticorps
CK	=	Créatine-Kinase
DEAE-Cellulose	=	Diéthylaminoéthyl-cellulose
EDTA	=	Ethylène diamino tétracétique acide
GERL	=	Golgi endoplasmic reticulum lysosome
I.M.	=	Intramusculaire
I.P.	=	Intrapéritonéal
I.V.	=	Intraveineux
Ki.	=	Constante d'inhibition
Km	=	Constante de Michaelis - Menten
LDH	=	Lactico-déshydrogénase
M.U.-glucoside	=	4 méthylumbelliféryl- α -D-glucopyranoside
PAS	=	Periodic acid Schiff
P.M.	=	Poids moléculaire
Pts	=	Protéines
SDS	=	Sodium dodécyl sulfate
Tris	=	Tris -(hydroxy méthyl)-amino-méthane
UDPG	=	Uridine diphosphoglucose
Vmax.	=	Vitesse maximale

REPERTOIRE DES TABLEAUX

	PAGES
<u>Tableau I</u> : Les principales maladies lysosomiales.....	14bis - 15
<u>Tableau II</u> : Schémas de purification de la maltase acide animale et humaine.....	24bis - 25
<u>Tableau III</u> : Constantes de sédimentation et de diffusion de l' α - 1,4-glucosidase animale et humaine.....	24
<u>Tableau IV</u> : Poids moléculaire de l' α -1,4-glucosidase acide ani- male et humaine.....	26
<u>Tableau V</u> : Composition en acides aminés de l' α -1,4-glucosidase acide de foie de boeuf.....	29
<u>Tableau VI</u> : Propriétés catalytiques de l' α -1,4-glucosidase puri- fiée.....	39bis - 40
<u>Tableau VII</u> : Classification des glycogénoses d'après CORI et BROWN et BROWN.....	57
<u>Tableau VIII</u> : Résumé clinique des observations de la littérature.	69bis - 71bis
<u>Tableau IX</u> : Résultats des analyses biochimiques dans les formes atypiques de glycogénose type II.....	76bis - 79
<u>Tableau X</u> : Purification de l' α -1,4-glucosidase acide placen- taire.....	103
<u>Tableau XI</u> : Etude de la contamination par les hydrolases lysoso- miales de la maltase acide placentaire purifiée....	105
<u>Tableau XII</u> : Propriétés de l' α -1,4-glucosidase placentaire puri- fiée.....	112
<u>Tableau XIII</u> : Fréquence de la glycogénose de type II dans notre laboratoire.....	116
<u>Tableau XIV</u> : Résultats des études biochimiques effectuées chez le patient n° 1.....	119
<u>Tableau XV</u> : Recherche d'une protéine immunologiquement réactive dans le coeur et le foie du patient n° 1 par la technique de consommation des anticorps.....	120
<u>Tableau XVI</u> : Résultats des études biochimiques effectuées sur une biopsie hépatique du patient n° 2.....	123
<u>Tableau XVII</u> : Résultats des déterminations de l'activité de l' α - 1,4-glucosidase à pH 4 dans les leucocytes des pa- tients n° 2, n° 3 et de leurs parents.....	125

<u>Tableau XVIII</u>	: Résultats des déterminations de l'activité de l' α -1,4-glucosidase acide dans les fibroblastes des patients n° 2, n° 3 et de leurs parents.....	127
<u>Tableau XIX</u>	: Essai d'activation de l' α -1,4-glucosidase acide des fibroblastes par les stéroïdes.....	128
<u>Tableau XX</u>	: Résultats des études biochimiques sur une biopsie musculaire du patient n° 4.....	133
<u>Tableau XXI</u>	: Résultats des déterminations de l'activité de l' α -1,4-glucosidase des leucocytes et des fibroblastes du patient n° 4.....	135
<u>Tableau XXII</u>	: Résultats des études biochimiques effectuées sur une biopsie musculaire du patient n° 5.....	138
<u>Tableau XXIII</u>	: Résultats des déterminations de l'activité de l' α -1,4-glucosidase des leucocytes et des fibroblastes du patient n° 5.....	142
<u>Tableau XXIV</u>	: Résultats des études biochimiques effectuées sur une biopsie musculaire du patient n° 6.....	143
<u>Tableau XXV</u>	: Résultats des déterminations de l'activité de l' α -1,4-glucosidase acide dans les leucocytes du patient n° 6 et dans ceux de quelques membres de la famille.	144

REPERTOIRE DES FIGURES

	<u>PAGES</u>
<u>Figure 1</u> : Séparation des lysosomes par diminution de densité.....	4 bis
<u>Figure 2</u> : La digestion lysosomiale.....	7 bis
<u>Figure 3</u> : L'enchaînement des molécules de glucose et leur mode de ramification dans la molécule de glycogène..	50 bis
<u>Figure 4</u> : La molécule de glycogène selon le modèle de G. CORI.....	50 bis
<u>Figure 5</u> : Le métabolisme du glycogène.....	56 bis
<u>Figure 6</u> : Schéma de l'appareillage utilisé pour la purification de l' α -1,4-glucosidase acide placentaire.....	100
<u>Figure 7</u> : Protocole d'immunisation utilisé pour l'obtention d'anticorps anti- α -1,4-glucosidase acide placentaire chez le lapin.....	100 bis
<u>Figure 8</u> : Dosage des anticorps anti- α -1,4-glucosidase acide selon la méthode d'OUCHTERLONY.....	101
<u>Figure 9</u> : Purification de l' α -1,4-glucosidase acide placentaire sur Séphadex G-100.....	104
<u>Figure 10</u> : Etude immunoélectrophorétique de la préparation d' α -1,4-glucosidase acide purifiée.....	101
<u>Figure 11</u> : Détermination du point isoélectrique de l'enzyme placentaire purifiée.....	107
<u>Figure 12</u> : Km de l'enzyme purifiée (Substrat : maltose).....	108
<u>Figure 13</u> : Km de l'enzyme purifiée (substrat : MU-glucoside)...	108
<u>Figure 14</u> : Influence de pH sur l'activité de l' α -1,4-glucosidase acide placentaire (substrat : MU-glucoside).....	110
<u>Figure 15</u> : Etude de la thermostabilité de l'enzyme purifiée....	111
<u>Figure 16</u> : Influence de différents ions sur l'activité de l'enzyme purifiée.....	113
<u>Figure 17</u> : Titrage des anticorps par inhibition de l'activité de la maltase acide.....	115
<u>Figure 18</u> : Etude de la spécificité des anticorps anti-maltase acide placentaire.....	115
<u>Figure 19a</u> : Etude ultrastructurale d'une biopsie hépatique du patient n° 2.....	122

<u>Figure 19b</u> : Etude ultrastructurale d'une biopsie musculaire du patient n° 4.....	122
<u>Figure 20</u> : Détermination de la Km de l' α -1,4-glucosidase musculaire du patient n° 2.....	124
<u>Figure 21</u> : Détermination de la Km de l' α -1,4-glucosidase acide leucocytaire du patient n° 2.....	126
<u>Figure 22</u> : Influence du pH sur l'activité de l' α -1,4-glucosidase urinaire du patient n° 2.....	129
<u>Figure 23</u> : Influence du chlorure de potassium sur l'activité de l' α -1,4-glucosidase urinaire (pH = 4,5).....	130
<u>Figure 24</u> : Electrophorèse sur acétate de cellulose à partir d'extraits de fibroblastes du malade n° 2, de ses parents et d'un témoin.....	132
<u>Figure 25</u> : Détermination de la Km de l' α -1,4-glucosidase acide musculaire du patient n° 4 (substrat MU-glucoside)..	134
<u>Figure 26</u> : Influence du pH sur l'activité de l' α -1,4-glucosidase musculaire du patient n° 4 (substrat : MU-glucoside).....	136
<u>Figure 27</u> : Détermination de la Km de l' α -1,4-glucosidase acide musculaire du patient n° 5 (substrat MU-glucoside).....	139
<u>Figure 28</u> : Influence du pH sur l' α -1,4-glucosidase musculaire du patient n° 5 (substrat MU-glucoside).....	140
<u>Figure 29</u> : Inhibition de l'activité résiduelle de l' α -1,4-glucosidase acide des fibroblastes du patient n° 5 par les anticorps spécifiques.....	141
<u>Figure 30</u> : Influence du pH sur l'activité de l' α -1,4-glucosidase urinaire des patients n° 6 et 7.....	145

TABLE DES MATIERES

	<u>PAGES</u>
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>PREMIERE PARTIE : L'ALPHA-1,4-GLUCOSIDASE ACIDE LYSOSOMIALE.</u>	
Propriétés de l'enzyme humaine et conséquences de son déficit.....	3
<u>I - LES LYSOSOMES ET LEUR EQUIPEMENT ENZYMATIQUE.....</u>	4
I-1. Rappel sur les lysosomes.....	4
I.1.1. La découverte des lysosomes.....	4
I.1.2. L'isolement des lysosomes et le contrôle de la séparation.....	4
I.1.3. Propriétés des lysosomes.....	6
I.1.4. La digestion lysosomiale.....	8
I.2. Les enzymes lysosomiales.....	9
I.2.1. Propriétés générales des enzymes lysosomiales...	9
I.2.2. Classification des enzymes lysosomiales.....	10
I.2.3. Synthèse et transport des enzymes lysosomiales..	11
I.2.4. Les déficits en enzymes lysosomiales et le concept de maladie lysosomiale congénitale.....	13
<u>II - L'ALPHA-1,4-GLUCOSIDASE ACIDE (MALTASE ACIDE).....</u>	17
II.1. Historique.....	17
II.2. Généralités sur les alpha-1,4-glucosidases.....	18
II.2.1. Définition.....	18
II.2.2. Classification.....	18
II.2.3. Spécificité.....	18
II.2.4. Mécanisme d'action.....	18
II.3. Purification de l'α-1,4-glucosidase acide et propriétés de l'enzyme purifiée.....	19
II.3.1. L'α-1,4-glucosidase acide des plantes, des bactéries et des champignons.....	19
II.3.2. L'α-1,4-glucosidase acide animale et humaine...	21

PAGES

II.4. Physiologie de l' α -1,4-glucosidase acide humaine.....	44
II.4.1. L' α -1,4-glucosidase acide des différents tissus et milieux biologiques humains.....	44
II.4.2. Rôle physiologique de l' α -1,4-glucosidase acide	50
III - <u>LE DEFICIT EN ALPHA-1,4-GLUCOSIDASE ACIDE ET SES CONSEQUENCES</u>	56
III.1. Place de la glycogénose de type II parmi les autres glycogénoses.....	56
III.2. La glycogénose de type II.....	58
III.2.1. Historique.....	58
III.2.2. Terminologie.....	59
III.2.3. La maladie de Pompe.....	59
III.2.4. Les formes atypiques de glycogénose de type II.....	69
III.2.5. Les tentatives thérapeutiques dans la glycogénose de type II.....	81
 <u>DEUXIEME PARTIE : L'ALPHA-1,4-GLUCOSIDASE ACIDE HUMAINE.</u>	
Etude de l'enzyme normale placentaire purifiée et de l'enzyme résiduelle des formes atypiques de glycogénose de type II. Application diagnostique.....	83
 I - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	84
I.1. Matériel.....	84
I.1.1. Les malades.....	84
I.1.2. Les tissus et milieux biologiques.....	89
I.1.3. Appareillage.....	92
I.2. Méthodes.....	92
I.2.1. Etudes en microscopie optique et électronique..	92
I.2.2. Analyse biochimique.....	93
I.2.3. Analyses électrophorétique , immunoélectrophorétique et focalisation électrique.....	95

PAGES

I.2.4. Technique de purification de l' α -1,4-glucosidase acide placentaire humaine.....	97
I.2.5. Préparation d'anticorps anti- α 1,4-glucosidase acide humaine.....	99
II - <u>RESULTATS</u>	103
II.1. Purification de l' α -1,4-glucosidase acide placentaire humaine, propriétés de l'enzyme purifiée et préparation d'anticorps spécifiques...	103
II.1.1. Purification de l'enzyme placentaire.....	103
II.1.2. Propriétés de l'enzyme purifiée.....	106
II.1.3. Etude des anticorps spécifiques anti- α 1,4-glucosidase acide placentaire.....	114
II.2. Etude des patients.....	116
II.2.1. Fréquence de la glycogénose de type II.....	116
II.2.2. Valeurs les plus fréquentes du glycogène et des enzymes de la glycogénolyse dans notre laboratoire.....	117
II.2.3. Résultats des malades.....	118
III - <u>DISCUSSION</u>	148
III.1. Méthodologie.....	148
III.1.1. Méthodes d'étude de l' α -1,4-glucosidase acide	148
III.1.2. Purification de l' α -1,4-glucosidase acide placentaire et propriétés de l'enzyme purifiée.....	151
III.2. Etude des patients.....	153
III.2.1. Fréquence de la glycogénose de type II.....	153
III.2.2. Valeurs les plus fréquentes du glycogène et des enzymes de la glycogénolyse dans notre laboratoire.....	153
III.2.3. Le ou (les) phénotype(s) de la glycogénose de type II.....	153
III.2.4. Pathogénie des formes atypiques de glycogénose de type II.....	157
III.2.5. Etude génétique de la glycogénose de type II.	158

PAGES

III.3. Contribution au diagnostic des formes atypiques de glycogénose de type II.....	160
III.3.1. Influence des ions phosphate sur l'activité de l' α -1,4-glucosidase acide placentaire purifiée.....	160
III.3.2. Diagnostic des formes atypiques de glycogénose de type II.....	161
III.3.3. Intérêt des urines dans le diagnostic des formes atypiques de glycogénose de type II : proposition d'un test diagnostic simple.....	163
<u>CONCLUSION</u>	166
<u>RESUME</u>	168
<u>SUMMARY</u>	170
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	172
<u>SIGNIFICATION DES ABREVIATIONS EMPLOYEES</u>	192
<u>REPERTOIRE DES TABLEAUX</u>	193
<u>REPERTOIRE DES FIGURES</u>	195
<u>TABLE DES MATIERES</u>	197

